



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**“Análisis de la variabilidad genética y cultivo *in vitro* de
Digitostigma caput-medusae (Cactaceae): Como estrategia
integral de conservación”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA AMBIENTAL)

PRESENTA:

MIGUEL HERNÁNDEZ ALVA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
Dr. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

TUTOR(A) INVITADO: M. en C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de junio de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **HERNÁNDEZ ALVA MIGUEL** con número de cuenta **300107830** con la tesis titulada "**Análisis de la variabilidad genética y cultivo in vitro de *Digitostigma caput-medusae* (Cactaceae): Como estrategia integral de conservación**", realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA:**

Presidente: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO
Vocal: M. EN. C. MARIANA ROJAS ARECHIGA
Secretario: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente: DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
Suplente: DR. JORGE NIETO SOTELO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de octubre de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Deseo otorgar un agradecimiento a:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, que a través de su apoyo institucional ha puesto en el mapa a muchos de los nuevos científicos mexicanos y que soportó mis estudios durante los dos años del programa.

Al CONACYT por haber aportado el apoyo económico mediante la Beca No. 239881 otorgada del año 2010 al 2012 para que este proyecto tan ambicioso pudiera realizarse.

Agradezco a mi Tutor Principal y a los miembros del Comité Tutorial:

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Tutor Principal).

A los miembros de mi Comité:

Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez del Instituto de Ecología de la UNAM.

Dr. Ángel Salvador Arias Montes del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM (Tutora Invitada).

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología y a su Jefe el Dr. Javier Caballero Nieto, por haber facilitado las instalaciones y apoyos materiales que fueron necesarios para esta noble labor.

Al Instituto de Biología, institución admirable y de gran trayectoria que ha visto egresar a una incontable cantidad de biólogos, entre los cuales me incluyo, esperando que la inversión realizada le sea retribuida al país.

Al jurado que reviso y aprobó esta tesis:

Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado.

M. en C. Mariana Rojas Aréchiga.

Dr. Ángel Salvador Arias Montes.

Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia.

Dr. Jorge Nieto Sotelo.

*A todos aquellas personas que aún viven
y creen en sus sueños de cambiar el Mundo,
toda mi complicidad, reconocimiento y agradecimiento*

Miguel Hernández-Alva

***Pero ni aún la opresión más severa puede detener eternamente el pensamiento humano.
Ni siquiera la amenaza de castigo en vida o del fuego en el infierno después de la muerte
puede impedir que las personas observen, piensen y razonen.***

Isaac Asimov

Deseo agradecer al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su sensible preocupación por este insensato y muchas veces incoherente estudiante. También, porque fue, en incontables casos, el soporte necesario para el satisfactorio término de esta obra. Dicho sea de paso, usted me mostró que la perseverancia y las firmes convicciones son la base de toda persona y claro, de todo científico.

A los miembros de mi Comité:

A la incansable Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez, del Instituto de Ecología de la UNAM, quien con sus acertadas recomendaciones y valiosa presión ayudó a formar mi carácter y sensibilidad ante los retos que la investigación científica impone.

A la metódica y paciente personalidad de la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar del Laboratorio de Biología Molecular de la UNAM, quien me mostró lo que significa el orden y la constancia en la elaboración de un trabajo tan fino como es la biología molecular, hoy en día, una de las ramas más fascinantes y productivas de la Biología.

Al brillante ejemplo de profesionalismo y vocación científica que significa el Dr. Salvador Arias Montes del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, de quien aprendí que la solidez de las bases metodológicas y las preguntas adecuadas son clave en las ciencias biológicas.

No diré poco sobre la personalidad de una de las investigadoras más importantes del área, pero tampoco diré mucho más de lo que se considera justo para el poco espacio que tengo, a la Dra. Teresa Terrazas del Instituto de Biología de la UNAM, le debo la capacidad de entender los sistemas vivos (al menos las plantas), desde el punto de vista de la anatomía y la morfología.

Uno de los puntos clave de este trabajo reside en los estudios de la germinación, en ese rubro, el ingenio y gran experiencia de la M. en C. Mariana Rojas Aréchiga, aportó las bases más sustanciales para facilitarme la entrada a ese hermoso e interesante campo.

Es raro que se mencionen a tantas personas involucradas en un tema y más raro aún que se mencione a tantas tan talentosas, con lo cual me siento sumamente agradecido y ofrezco mi más profundo respeto a las Instituciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, al mismo Instituto de Biología, a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por favorecer la formación de mi persona como científico y como ser humano.

A mi futura esposa, amiga, pareja y confidente Carmina de la Luz Ramírez, gracias por apoyarme con tu amor y paciencia. No hay otra persona con quién quisiera estar y envejecer ¡Sólo tú! Te amo!!

Bien ke hue kazinka

Mi madre Maura Alva Duarte, quien ha hecho un gran esfuerzo para poder ver a sus hijos triunfar.

Mis hermanas y hermanos que no dejaron de alentarme en este difícil camino y siempre me apoyaron para terminarlo.

Mis extraordinarios y pequeños sobrinos, por ser tan pacientes conmigo y por enseñarme a pensar como niño una vez más.

Agradezco a todos y tantos amigos que acompañaron esta labor científica y que sin duda siguen ahí para mí y yo para ellos.

ÍNDICE

Resumen	xii
Abstract	xiii
Introducción	1
Antecedentes	2
Conservación	2
Marco legal nacional e internacional de la conservación de plantas	3
Factores que afectan a la permanencia y extinción de las especies	4
La familia Cactaceae	5
Conservación de cactáceas mexicanas	7
Relevancia de <i>Astrophytum</i> y <i>Digitostigma</i>	8
Síntesis de los trabajos con las especies de los géneros <i>Astrophytum</i> y <i>Digitostigma</i>	9
Objetivos general y particulares	12
Materiales y Métodos	13
Síntesis taxonómica de <i>Astrophytum</i>	13
Género <i>Astrophytum</i> Lem.	13
1.1 <i>Astrophytum asterias</i> Zucc. (Lem)	13
1.2 <i>Astrophytum capricorne</i> (Dietrich) Britton et Rose	15
1.3 <i>Astrophytum coahuilense</i> (H.Möller) Kaufer	16
1.4 <i>Astrophytum myriostigma</i> Lem.	17
1.5 <i>Astrophytum ornatum</i> (DC.) F.A.C. Weber ex Britton et Rose	18
Síntesis taxonómica del género <i>Digitostigma</i>	19
Género <i>Digitostigma</i> Velazco et Nevárez	19
2. <i>Digitostigma caput-medusae</i> Velazco y Nevárez	19
Capítulo 1. Avances para la evaluación de la diversidad genética en <i>Digitostigma caput-medusae</i> (Cactaceae), una especie en peligro de extinción y endémica del noreste de México	22
Capítulo 2. Cultivo in vitro e injerto en <i>Digitostigma caput-medusae</i> (Cactaceae), técnicas complementarias para su conservación	32
Capítulo 3. Estudio comparativo de la morfología, crecimiento y secuencia ontogenética de los meristemos apicales del tallo en plántulas de los géneros <i>Astrophytum</i> y <i>Digitostigma</i> (Cactaceae)	50
Conclusiones generales	71
Bibliografía general	73
Apéndice 1	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1. Factores que ponen en riesgo de extinción a los taxones vegetales	5
Figura 2. Ejemplar adulto de <i>Astrophytum asterias</i> .	14
Figura 3. Ejemplar adulto de <i>Astrophytum capricorne</i> .	15
Figura 4. Ejemplar adulto de <i>Astrophytum coahuilense</i> .	16
Figura 5. Ejemplar adulto de <i>Astrophytum myriostigma</i> .	17
Figura 6. Ejemplar adulto de <i>Astrophytum ornatum</i> .	18
Figura 7. Ejemplar adulto de <i>Digitostigma caput-medusae</i> .	21
Figura 8. Fig. 8. Extracciones de ADN de los 15 individuos provenientes de la UMA “Proyecto <i>Digitostigma</i> ” y 2 individuos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM en gel de agarosa 2%.	26
Figura 9. Amplificación del primer <i>AaB6</i>	27
Figura 10. Amplificación del primer <i>AaH11</i>	27
Figura 11. Desarrollo de plántulas de <i>D. caput-medusae</i> en cultivo <i>in vitro</i>	40
Figura 12. Respuestas morfogénicas de los explantes a partir de plántulas de <i>D. caput-medusae</i> para las seis concentraciones del LTH1	43
Figura 13. Secuencias morfogénicas obtenidas de los explantes de plántulas de <i>D. caput-medusae</i> en el lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2).	44
Figura 14. Propagación por injerto de <i>Digitostigma caput-medusae</i> sobre <i>Ferocactus cylindraceus</i>	47
Figura 15. Secuencia de crecimiento de las plántulas	57
Figura 16. Gráficas del crecimiento y desarrollo de las plántulas.	60
Figura 17. Anatomía del meristemo apical del tallo de plántulas de <i>Astrophytum asterias</i>	62
Figura 18. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de <i>Astrophytum capricorne</i>	63
Figura 19. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	64
Figura 20. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de <i>Astrophytum ornatum</i>	65
Figura 21. Anatomía del meristemo apical del tallo de plántulas de <i>Digitostigma caput-medusae</i>	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Temas abarcados y trabajos publicados sobre el género <i>Astrophytum</i> y <i>Digitostigma caput-medusae</i>	10
Cuadro 2. Síntesis de información ecológica y situación de amenaza de las especies del género <i>Astrophytum</i> y <i>Digitostigma caput-medusae</i>	21
Cuadro 3. Claves e identificación de las muestras de 17 individuos de <i>D. caput-medusae</i> provenientes de la UMA “Proyecto <i>Digitostigma</i> ” y de la Colección de Investigación de Cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM	24
Cuadro 4. Loci de microsatélites de <i>A. asterias</i>	25
Cuadro 5. Microsatélites seleccionados por amplificación positiva (<i>AaB6</i> y <i>AaH11</i>)	28
Cuadro 6. Ejemplos de especies de la familia Cactaceae propagadas por cultivo <i>in vitro</i>	34
Cuadro 7. Concentraciones de RCV en mg/L para el lote de tratamientos hormonales 1 (LTH1)	38
Cuadro 8. Concentraciones de RCV en mg/L para el lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2)	38
Cuadro 9. Descripción de las diferentes respuestas morfogénicas para los 6 tratamientos hormonales del LTH1	42
Cuadro 10. Semillas de las especies del género <i>Astrophytum</i> y de <i>Digitostigma caput-medusae</i> (edad y fecha de colecta)	53
Cuadro 11. Mediciones de las características distintivas de los meristemas apicales del tallo de las especies <i>A. asterias</i> , <i>A. capricorne</i> , <i>A. myriostigma</i> , <i>A. ornatum</i> y <i>D. caput-medusae</i> .	68

RESUMEN

La descripción de *Digitostigma caput-medusae* en 2002, y su probable extinción 11 años después, plantea las siguientes preguntas de cara a la elaboración de una estrategia integral para su conservación ¿Cómo se encuentra la variabilidad genética dentro de los pocos individuos que se encuentran en las colecciones de la UMA “Proyecto *Digitostigma*” y en Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM? ¿Cómo se le puede regenerar *in vitro* y por medio de injerto? Y finalmente, ¿Qué aspectos morfológicos a nivel de plántulas y qué aspectos anatómicos a nivel de meristemo apical de tallo tienen en común las especies del género *Astrophytum* y *Digitostigma caput-medusae*? Estas tres preguntas fundamentales se abordaron en este trabajo. Se utilizaron seis loci diseñados para *Astrophytum asterias*, se detectaron 14 alelos totales en 17 individuos de *Digitostigma caput-medusae*. Siete de los 15 ejemplares de la UMA resultaron heterocigos, 8 fueron clones de varias plantas originales y cruza de ellas y sólo uno de los ejemplares restantes fue heterocigo para ambos loci. La regeneración de brotes *in vitro* por organogénesis directa a partir de la región del epicotilo se obtuvo en la concentración de 1mg/L de BA en ausencia de auxinas, mientras que en las concentraciones de 0.1 mg/L (ANA)/0.0 mg/L(BA); 0.1 mg/L (ANA)/1.0 mg/L (BA); 0.0 mg/L (ANA)/2.0 mg/L (BA); 0.1 mg/L (ANA)/2.0 mg/L (BA) se produjo solo abundante callo verde, friable, hiperhidratado y no regenerante. También se reporta organogénesis indirecta de raíces en el caso de la concentración 0.1 mg/L (ANA)/2.0 mg/L (BA). Ningún tipo de respuesta surgió en el caso del tratamiento control en completa ausencia de hormonas. Las plántulas de *D. caput-medusae* con sus grandes cotiledones e hipocótilo delgado y cilíndrico, fueron más afines a las plántulas de taxones de las subfamilias Pereskioideae y Opuntioideae. Por otro lado, los cotiledones reducidos de las plántulas del género *Astrophytum* fueron un carácter derivado comparado con los cotiledones de plántulas de las subfamilias antes mencionadas. Según la secuencia del desarrollo de las plántulas se distinguió que *A. asterias*, *A. capricorne* y *D. caput-medusae* tuvieron hipocótilos y raíces contráctiles lo que permitió el desarrollo de tallos parcial o totalmente hipogeos en plantas de más de un año de edad. En ambos géneros las plántulas tuvieron hipocótilos epigeos durante los primeros 90 días de edad. Las plántulas más pequeñas de ambos géneros fueron las de *A. asterias*, seguidas de *D. caput-medusae*, *A. capricorne*, *A. myriostigma* y finalmente la más grande correspondió a la especie *A. ornatum*. Sin embargo, en cuanto a diámetro de meristemo apical del tallo se refiere, *D. caput-medusae* tuvo los valores más bajos, seguida de *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. ornatum* y los valores más altos los mostró *A. myriostigma*. Todas las especies del género *Astrophytum* y *D. caput-medusae* presentaron un meristemo apical del tallo con una sola capa de células de la túnica, un corpus bien estructurado y no se determinó la presencia de células madre en los cortes pero sin descartar su papel en el desarrollo del corpus.

ABSTRACT

Description of *Digitostigma caput-medusae* in 2002, and its probable extinction 11 years later, brings the following questions to face a comprehensive conservation strategy: What level of genetic variability remains within the few individuals that are in the collections from the UMA "Project *Digitostigma*" and from the Jardín Botánico del Instituto de Biología of the UNAM? How can be regenerated in vitro and by graft? And finally, What aspects at the level of seedling morphological and anatomical aspects at the level of apical meristem of stem are in common species between *Astrophytum* and *Digitostigma caput-medusae*? These three fundamental questions were addressed in this study. Using six loci designed previously in *Astrophytum asterias*, were found 14 loci within 17 individuals of *Digitostigma caput-medusae*. Seven of the 15 copies from the UMA were polymorphic, 8 were clones of several original plants and crosses of them and only one individual was polymorphic for both loci. *In vitro* shoot regeneration by direct organogenesis from epicotyl region was obtained at the concentration of 1 mg/L of BA and no concentration of auxins, while concentrations of 0.1 mg/L (ANA) / 0.0 mg/L (BA); 0.1 mg/L (ANA) / 1.0 mg/L (BA); 0.0 mg/L (ANA) / 2.0 mg/L (BA); 0.1 mg/L (ANA) / 2.0 mg/L (BA) produced only abundant green, hyperhydrated, friable and no regenerating callus. Also reported indirect organogenesis of roots in the concentration 0.1 mg/L (ANA) / 2.0 mg/L (BA). No response in the case of the control treatment with complete absence of plant growth regulators. Size of the cotyledons of seedlings of the genus *Astrophytum* indicated that they was a derived carácter compared with *Pereskioideae* and *Opuntioideae* cotyledons. Seedlings of *D. caput - medusae* with its large cotyledons and slim and cylindric hypocotyl, were more like seedlings of *Pereskioideae* and *Opuntioideae*. In both genera hypocotyl were epigeus from 5 to 90 days old seedlings. Seedlings of species *A. asterias*, *A. capricorne* and *D. caput-medusae* had contractible hypocotyl and roots and developed a hipogeous shoot and roots for 1 year old seedlings. The smaller seedlings of both genera were those of *A. asterias*, followed by *D. caput - medusae*, *A. capricorne*, *A. myriostigma* and finally, the largest corresponded to *A. ornatum*. However, in terms of diameter of shoot apical meristem (SAM) was concerned, *D. caput - medusae* had the lowest values, followed by *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. ornatum* and the highest values showed by *A. myriostigma*. All species of the genus *Astrophytum* and *D. caput-medusae* presented a SAM with a single layer of cells of the tunica layer, a well-structured corpus and central mother cells were not clearly identified.

INTRODUCCIÓN

Un estudio integral para la conservación de un elemento de la vida silvestre incluye la convergencia de conceptos, puntos de vista y métodos provenientes de diversas disciplinas, ramas o ciencias. La integración de esos saberes diversos en un enfoque complejo no implica una idea totalizadora del objeto de estudio sino la comprensión del mismo objeto de estudio y la inserto en un mundo cambiante y susceptible de ser cambiado (Leff, 2007).

Por otro lado, el concepto de conservación ha sido incluido dentro de la legislación ambiental mexicana en la Norma Oficial Mexicana 059, donde se define como: “la protección, cuidado, manejo y mantenimiento de los ecosistemas, los hábitats, las especies y las poblaciones de la vida silvestre, dentro o fuera de sus entornos naturales, de manera que se salvaguarden las condiciones naturales para su permanencia a largo plazo” (SEMARNAT, 2010).

A la fecha, la conservación de las cactáceas mexicanas amenazadas no ha sido muy exitosa, en parte por la falta de datos sobre su biología y también por la complejidad que representa el manejo y protección de las poblaciones silvestres.

El género *Astrophytum* se encuentra incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Dichas especies reconocidas y sus categorías de riesgo son: *Astrophytum asterias* (en peligro de extinción, P), *A. capricorne* (amenazada, A), *A. myriostigma* (amenazada, A) y *A. ornatum* (amenazada, A). Por otro lado, *Digitostigma caput-medusae* (en peligro de extinción, P) presenta un estado crítico en la única población existente, hay pocos individuos en las colecciones biológicas y además se conoce poco sobre su biología.

En este trabajo se presentan avances sobre la biología de las especies de *Astrophytum* y sobre todo sobre *Digitostigma caput-medusae*, que podrían ser útiles para contribuir a la conservación de las mismas al mediano y largo plazo.

ANTECEDENTES

Conservación

Las estrategias de conservación se pueden agrupar en dos líneas generales, es decir, *in situ* y *ex situ*. La primera línea se remite a las actividades realizadas en el mismo lugar de distribución del taxón, tales como el manejo de su hábitat, el manejo de sus poblaciones, la restauración, la reforestación, la reintroducción, la traslocación, el manejo de especies invasoras y las plantaciones forestales, por mencionar algunas (Guerrant *et al.*, 2004). La segunda línea engloba a las estrategias propias de los jardines botánicos y los jardines zoológicos, que albergan especies fuera de su hábitat natural (Maunder *et al.*, 2004). Muchas técnicas y estrategias de manejo fuera del hábitat pueden ser llevadas a cabo dentro de los ámbitos locales de los taxones, sin embargo, la mayor limitante para su implementación son la falta de recursos humanos, presupuesto e infraestructura. En caso de carencia de personal, recursos monetarios e infraestructura, la investigación *ex situ* es prioritaria y podría esperarse que en algún momento tales investigaciones debieran ser exportadas a las áreas de distribución natural de los taxones. Sin duda, esta perspectiva por demás optimista, no ha ofrecido abundantes resultados, pues la crisis ambiental y los problemas sociopolíticos de las zonas más biodiversas del mundo no ofrecen los escenarios más favorables para implementación de conservación *in situ* (Maunder *et al.*, 2004).

La conservación *ex situ* se pone en práctica en más de 1,800 jardines botánicos a nivel mundial y que albergan más de 2.5 millones de accesiones de plantas cultivadas y que estas representan más de 80, 000 especies (Maunder *et al.*, 2004). Cabe señalar que la mayoría de las colectas están constituidas por muestras pequeñas y poco representativas desde el punto de vista genético y la documentación es, por lo general, pobre (Maunder *et al.*, 2004). Aún con esas deficiencias, los jardines botánicos han sabido afrontar el reto y se han podido mantener los programas de investigación científica en la mayoría de ellos, pues gracias a su trabajo se cuenta con protocolos de propagación de las plantas más amenazadas y también, gracias a ellos, se cuenta con estudios de morfología, anatomía, fisiología, germinación, sistemática, taxonomía, genética y ecología de plantas en general. Con este escenario, los jardines botánicos del mundo asumen el reto nada fácil de poner en práctica

las herramientas y procesos más efectivos para alcanzar las metas previamente adquiridas con la conservación mundial y lograr que sus productos estén disponibles para los propósitos de restauración y conservación en el momento que sean requeridos (IUCN-UNEP-WWF, 1980; IUCN-UNEP-WWF, 1991; Maunder *et al.*, 2004).

Marco legal nacional e internacional de la conservación de plantas

En la Estrategia Nacional sobre la Biodiversidad de México (ENBM) se establece una visión a cincuenta años en la que México habrá detenido y revertido los procesos de deterioro ambiental que amenaza su vasta diversidad, esto a través de las siguientes cuatro líneas estratégicas: a) protección y conservación; b) valoración de la biodiversidad; c) conocimiento y manejo de la información; d) diversificación del uso. Estas cuatro líneas reflejan también, una visión global o integral para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad de México en convenio y coordinación con organizaciones internacionales como son el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y el Fondo Fiduciario para el Medio Ambiente Mundial (CONABIO, 2000).

Por otro lado, gracias a la firma del Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) (ONU, 1992), se contó con un eje rector para la formulación de la Estrategia Global para la Conservación Vegetal (GSPC, por sus siglas en inglés) en 2002. Posteriormente, como parte de los compromisos de esta última estrategia, surge la Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal (EMCV) en 2007, que si bien, es una estrategia local, no deja de estar coordinada de manera global para alcanzar las metas impuestas con el CDB (CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008). Dicha estrategia mexicana tiene una visión, una misión, cinco objetivos y 22 metas, que funcionan como ejes fundamentales (CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008). Los cinco objetivos son: 1) Documentar e integrar la información relativa a la diversidad vegetal. 2) Conservar la diversidad vegetal. 3) Utilizar de forma sostenible la diversidad vegetal y propiciar el reparto justo de sus beneficios. 4) Promover la educación y concientización acerca de la diversidad vegetal. 5) Crear y fortalecer las capacidades para la conservación de la diversidad vegetal (CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008).

Así pues, la estrategia contempla tomar como principio el conocimiento científico para así, diseñar las estrategias de conservación y usos sustentables de los recursos vegetales, tomando en cuenta que una de las herramientas más poderosas son la educación y la coordinación transversal entre las instituciones gubernamentales, ONG's y la ciudadanía en general (SEMARNAT-CONANP, 2007; CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008; Bezaury-Creel y Gutiérrez Carbonell, 2009).

Factores que afectan a la permanencia y extinción de las especies

Existen abundantes trabajos que documentan la situación crítica actual de taxones diversos (Oldfield, 1997; Lande, 1998; Maunder *et al.*, 2004; Gaston, 2005; Pertoldi *et al.*, 2008; Bezaury-Creel y Gutiérrez Carbonell, 2009).

Los factores que ponen en riesgo de extinción a los taxones vegetales y animales se pueden agrupar en tres categorías según Lande (1998), *antropogénicos*, *ecológicos* y *genéticos*. Los factores *antropogénicos* incluyen a su vez, a los proyectos de desarrollo de tierras (industriales, habitacionales y agropecuarios), la sobreexplotación de ecosistemas, descarte económico, introducción de especies exóticas e invasoras, destrucción de hábitats y contaminación. Entre los factores *ecológicos* contamos con las fluctuaciones y catástrofes ambientales, la dinámica poblacional, el tamaño pequeño de las poblaciones, el efecto Allee (en poblaciones de baja densidad, de baja tasa de crecimiento y poco dinámicas) y el efecto de borde. Finalmente, se mencionan los factores *genéticos* con la traslocación disfuncional, la hibridización, la crianza selectiva, la extracción de individuos del hábitat, tamaños poblacionales pequeños, pérdida de variación genética y la fijación de nuevas mutaciones. En la Figura 1 se muestran los factores anteriores y aquellos que aparecen en letras cursivas son los factores que interactúan en el caso de *Digitostigma caput-medusae*.

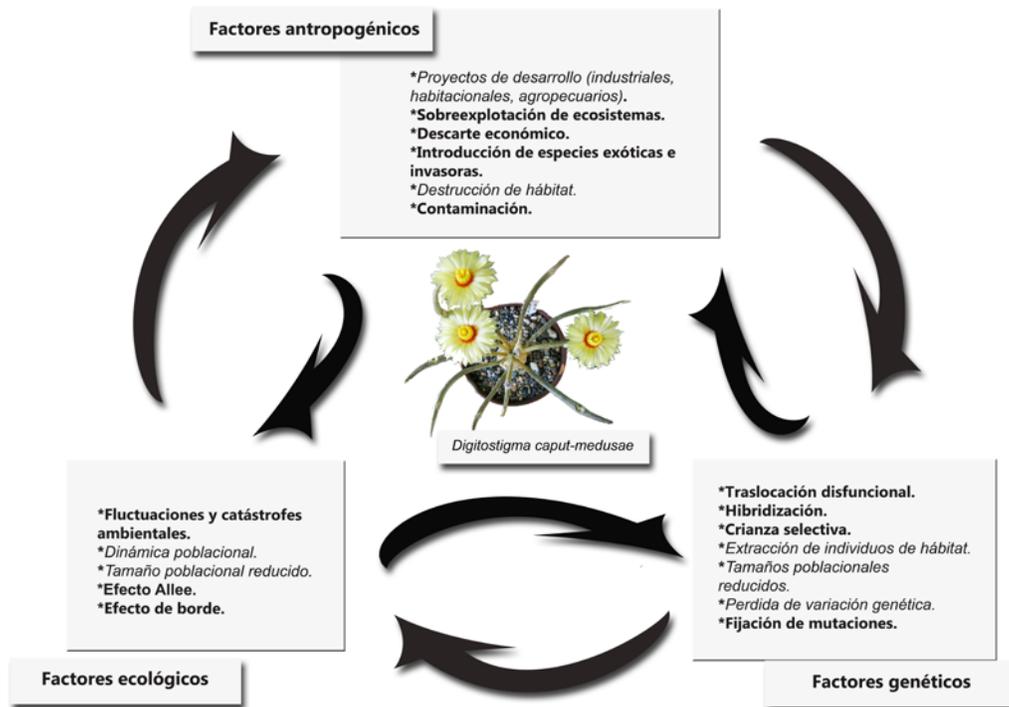


Figura 1. Factores que ponen en riesgo de extinción a los taxones vegetales. Adaptado de Lande (1998).

*Factores que amenazan a la especie objeto de este estudio *Digitostigma caput-medusae*.

En conjunto, todos estos factores afectan a los taxones de forma dinámica en tiempo y espacio, por lo general, produciendo la afectación de sus ciclos vitales individuales y luego a escala poblacional. Las respuestas de los organismos dependerán de sus tamaños y estructuras poblacionales, su estructura genética poblacional y el tiempo que dure la presión (Lande, 1998).

La familia Cactaceae

En el continente americano se encuentra la distribución original y exclusiva de las que son por sí mismas, las suculentas más populares del mundo, los cactus (familia Cactaceae). Con sus más de 1500 especies, la familia Cactaceae se distribuye desde las planicies al norte de Canadá hasta las tierras lejanas de la Patagonia en Argentina, pasando por México donde alcanza su mayor riqueza y mayor variedad de formas de vida (Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Aguilar-Morales *et al.*, 2011).

En los 1, 972, 544 km² que comprenden la vasta extensión territorial de México se concentra entre el 10 al 12% del total de la flora del mundo (Rzedowski, 1991; CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008). Según el estudio más reciente de la flora mexicana, se estimó que en México existen entre 22, 000 y 31, 000 especies, las cuales se encuentran agrupadas en 2,663 géneros, de los cuales 218 son considerados endémicos (Villaseñor, 2004; Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). Dentro de esa gran riqueza vegetal que alberga el territorio nacional, se cuentan 913 taxones de la familia Cactaceae que reconoce Guzmán-Cruz y colaboradores para el año 2003. Esos mismos autores mencionan que 25 géneros, 518 especies y 206 subespecies de cactáceas son endémicos para México.

La familia Cactaceae contiene plantas suculentas que se caracterizan por sus tallos crasos, reducción y pérdida de la lámina de las hojas, hipertrofia del pecíolo hasta su transformación en un podario o tubérculo, modificación de las yemas hasta su conformación en areolas, espinación diversa y un metabolismo de tipo ácido de las crasuláceas (MAC) (Bravo-Hollis, 1978). La gran mayoría de las especies de esta familia pueden presentar espinas que les son útiles como defensa ante depredadores, reductores mecánicos de la exposición solar y aislantes térmicos, pues habitan en zonas áridas, semiáridas, templadas y tropicales con condiciones extremas y estación seca marcada (Bravo-Hollis, 1978; Mauseth, 2006). Estas plantas presentan una gran cantidad de formas de vida, tales como arbustos, árboles foliados, plantas columnares, globosas, cilíndricas, en forma de barril y la clásica forma de nopalera (Mauseth, 2006). Esta familia incluye a las cuatro subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae, Maihuenioideae y Cactoideae, esta última subfamilia es considerada la más diversa en cuanto a formas de vida y presenta hojas diminutas, muchas especies tienen cambios dramáticos entre los estadios juveniles y adultos (Barthlott y Hunt, 1993; Mauseth, 2006).

Estas plantas entrañan una gran cantidad de usos ancestrales, actuales y sin duda no dejarán de sorprender con abundantes usos potenciales. Algunas han sido colectadas y utilizadas como alimento desde hace aproximadamente 9,600 años en zonas como Puebla, Oaxaca y el norte del país, por la gran cantidad de agua que almacenan en sus tejidos, por la gran cantidad de hidratos de carbono en sus frutos, así como por las proteínas y grasas que presentan sus semillas. Los otros usos incluyen la construcción de cercas, casas, marcaje de parcelas, forrajes, medicinas, gomas, jabón, y como adornos de casas y patios (Bravo-

Hollis y Scheinvar, 2002; Mauseth, 2006; Brailovsky Signoret, 2008).

Conservación de cactáceas mexicanas

Hay diversos factores sociales, económicos, geográficos, administrativos, científicos y biológicos que interactúan de manera compleja en la conservación de las cactáceas (Álvarez *et al.*, 2004; García-Gómez, 2009; Ureta y Martorell, 2009). Entre estos factores podemos mencionar: el cambio de uso de suelo; prácticas agrícolas de roza-tumba y quema; la construcción de infraestructura como carreteras, zonas habitacionales e industriales no reguladas; el comercio y tráfico ilegal de especies; el saqueo de sus poblaciones por turismo y colectores nacionales y extranjeros; el bajo número de viveros especializados en propagar las especies más demandadas y raras; la falta de empleo y pobreza en zonas de alto endemismo; la ausencia de información confiable sobre técnicas de propagación y mantenimiento de plantas madre; la poca capacidad y poca vinculación de parte de las autoridades encargadas de proteger y vigilar el cumplimiento de las leyes en materia ambiental; la falta de vinculación entre la parte académica, gubernamental y las personas interesadas en generar viveros y comercializar; la legislación impráctica y sumamente burocrática construida en su mayoría desde la perspectiva de manejo de animales y que es incompatible con las necesidades de las plantas. Por si fuera poco, muchas de las especies de cactus tienen dinámicas poblacionales tan particulares y tasas de crecimiento tan lentas que su conservación en hábitat es tarea nada fácil, sobre todo si no se puede asegurar la integridad del mismo (Becerra, 2000; Álvarez *et al.*, 2004; Bárcenas, 2006; Ureta y Martorell, 2009). Toda esta dinámica compleja ha generado que el estado de conservación de una gran parte de las especies de cactus mexicanos sea precario y que se encuentren en alguna categoría de riesgo (Becerra, 2000).

Por citar algunos ejemplos, en 1994, un solo individuo de las especies *Geohintonia mexicana* y *Aztekium hintonii* fue valuado en dos mil dólares por compradores japoneses en el mercado negro (Becerra, 2000). Otro lamentable caso es el de *Ariocarpus bravoanus* subsp. *bravoanus* (chautle), planta descubierta a principios de la década de 1990, y cuya población era de sólo unos cientos en el extremo sur del Desierto de Chihuahua. Los recolectores sin escrúpulos la hallaron y extirparon más del 75% de las plantas. Por fortuna

se halló una segunda población de varios miles, pero la recolección de plantas y semillas sigue siendo un problema para su conservación (Marinelli, 2006). La alarmante situación que enfrenta *Mammillaria herrerae* al tener poblaciones extremadamente pequeñas (sólo 50 individuos en un área de 1 km²) y la pérdida de cerca del 95% de las plantas silvestres en los últimos 20 años como producto de la colecta ilegal, es otro ejemplo de la constante amenaza a muchas especies de cactus (Sánchez-Martínez *et al.*, 2008). Como muy bien menciona Rosalba Becerra (2000), “la mayoría de las especies de cactáceas que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida, o son especies recientemente descubiertas por la ciencia, por lo que se conoce muy poco de su biología”.

No obstante, hasta la fecha, los esfuerzos conjuntos de conservación por parte de las instancias gubernamentales y la comunidad científica han colocado a 276 especies de cactus dentro de alguna de las categorías de plantas amenazadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). A nivel internacional más de 40 especies se encuentran en el Apéndice I de la CITES, mientras que todas las especies de la familia se encuentran en el Apéndice II (CITES, 2013). Finalmente, el Libro Rojo de la IUCN (2013) contempla a 113 taxones entre las categorías de Extinta, Extinta en medio silvestre, Críticamente amenazada, Amenazada y Vulnerable.

*Relevancia de *Astrophytum* y *Digitostigma**

El género *Astrophytum* es uno de los más populares desde que fue descrita el primer taxón en 1828, por De Candolle (Kleszewski y Hooek, 2007). A esta especie se le asignó el nombre de *Echinocactus ornatum* (hoy conocida como *Astrophytum ornatum*). Estas plantas son apreciadas en todo el mundo pues poseen tallos característicos en forma de estrella, al mismo tiempo, los tallos están cubiertos por abundantes tricomas blanco grisáceos que se presentan con patrones caprichosos tales como bandas y puntos, dando una apariencia de nieve. Otro rasgo importante son las grandes flores amarillas con gargantas rojas o completamente amarillas que pueden alcanzar los 5 cm de diámetro (Kleszewski y Hooek, 2007; Cappers *et al.*, 2009).

Además de su belleza natural, estas plantas también tienen la facultad de generar

híbridos artificiales entre sí. Por esto y por la relativa facilidad de su cultivo que están entre las especies de cactáceas más importantes a nivel internacional (Kleszewski y Hooek, 2007).

El caso de *Digitostigma caput-medusae*, se trata de una de las especies más raras encontradas hasta ahora en México, su rareza morfológica y geográfica no tiene comparación y su importancia económica seguirá en aumento por su supuesta capacidad de formar híbridos artificiales con las especies del género *Astrophytum*.

Síntesis de los trabajos con las especies de los géneros Astrophytum y Digitostigma

Como se puede apreciar en el Cuadro 2, hasta el momento, los dos trabajos publicados más importantes por la cantidad de especies y temas que abordan son la Tesis de Maestría de White Olascoaga (2006) y el suplemento de la revista *Piante Grasse* de Kleszewski y Hooek (2007). El primer trabajo presenta avances en lo que respecta a la morfología de plántulas, el desarrollo de costillas, aréolas y espinas; la descripción de la epidermis, las semillas, flores y tricomas; y la descripción de su distribución. Cabe señalar que White Olascoaga (2006) no reconoce a *A. coahuilense* como una especie independiente de *A. myriostigma* y considera a *D. caput-medusae* como una especie del género *Astrophytum* debido a los trabajos de Hunt (2003a, 2003b, 2005) y por los rasgos compartidos entre ambos géneros (flor, fruto, semilla y tricomas). Sin embargo, Kiesling (2007) menciona el debate de si *D. caput-medusae* es un nombre específico y género inválidos y se inclina por continuar conservando a *Digitostigma* como género monoespecífico por distintas razones biológicas y de nomenclatura.

El segundo trabajo incluye datos relevantes de la distribución, biología y clasificación de los *Astrophytum*, complementados con información de cultivo. Al mismo tiempo, retoma a *A. coahuilense* como una especie válida y a *D. caput-medusae* como la última especie descrita de *Astrophytum*.

Los estudios de germinación se han realizado con bastante frecuencia para algunas especies del género *Astrophytum* y entre ellos destacan los de Flores y colaboradores (2011), Muro Pérez (2011), Sánchez Salas y colaboradores (2006), Zepeda Martínez (2010) y Rojas-Aréchiga y colaboradores (2013).

Otros temas sobre la biología de algunas de las especies del género *Astrophytum* han sido cubiertos parcialmente, como son: el contenido cromosómico, la propagación *in vitro*, los sistemas de apareamiento, la dinámica de poblaciones, la diversidad genética, los requerimientos para el establecimiento de las plantas, los métodos de apareamiento y el Método de Evaluación de Riesgo de Extinción o MER (Das *et al.*, 2000; Santos Díaz, 2001; Martínez-Ávalos *et al.*, 2004; Terry *et al.*, 2006; White Olascoaga, 2006; Mendoza Madrigal, 2007; Strong y Williamson, 2007; Martínez-Ávalos, 2007; Reza, 2008; López-Flores y Golubov, 2010; Sánchez Salas *et al.*, 2010; Zepeda Martínez, 2010; Bravo Espinosa, 2011; Muro Pérez, 2011).

Por otro lado, la filogenia de *Astrophytum* y *Digitostigma* dentro de la Tribu Cacteeae ha sido abordada recientemente por Vázquez-Sánchez y colaboradores (2013) y con anterioridad por los trabajos de Butterworth y colaboradores (2002) y Bárcenas y colaboradores (2011). Los tres trabajos concluyen que hay evidencia suficiente para incluir a *D. caput-medusae* dentro del género *Astrophytum* como ya se venía proponiendo desde los trabajos de Hunt (2003a, 2003b, 2005).

Finalmente, el campo que aún queda por explorar es el de anatomía de meristemos apicales y desarrollo de plántulas de algunas de las especies de *Astrophytum* y *Digitostigma caput-medusae*. Así como la descripción de distintas estrategias de propagación como el cultivo *in vitro* y el injerto.

Cuadro 1. Temas abarcados y trabajos publicados sobre el género *Astrophytum* y *Digitostigma caput-medusae*. *Significa que la zona de estudio de este autor estuvo fuera de México (Texas, EUA).

Característica estudiada	<i>A. asterias</i>	<i>A. capricorne</i>	<i>A. coahuilense</i>	<i>A. myriostigma</i>	<i>A. ornatum</i>	<i>D. caput-medusae</i>
Semillas (morfología)	White Olascoaga	White Olascoaga, 2006; Este trabajo	No hay reportes	White Olascoaga, 2006; Barthlott y Hunt, 2000; Este trabajo	White Olascoaga, 2006; Este trabajo	No hay reportes
Plántula	Este trabajo	White Olascoaga, 2006; Este trabajo	No hay reportes	White Olascoaga, 2006; Este trabajo	White Olascoaga, 2006; Este trabajo	Este trabajo
Germinación	Flores <i>et</i>	Muro Pérez,	No hay	Muro Pérez,	Muro Pérez,	Este trabajo

	<i>al.</i> , 2011; Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> , 2013	2011; Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> , 2013	reportes	2011; Sánchez Salas <i>et al.</i> , 2006; Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> , 2013	2011; Zepeda Martínez, 2010; Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> , 2013	
Meristemo apical	Este trabajo	Este trabajo	No hay reportes	Este trabajo	Este trabajo	Este trabajo
Análisis de contenido cromosómico	Das <i>et al.</i> , 2000; White Olascoaga, 2006	Das <i>et al.</i> , 2000; White Olascoaga, 2006	No hay reportes	Das <i>et al.</i> , 2000; White Olascoaga, 2006	Das <i>et al.</i> , 2000; White Olascoaga, 2006	No hay reportes
Epidermis	White Olascoaga, 2006	White Olascoaga, 2006	No hay reportes	White Olascoaga, 2006	White Olascoaga, 2006	No hay reportes
Propagación (in vitro)	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	Santos Díaz, 2001	Mendoza Madrigal, 2007	Este trabajo
Distribución geográfica	White Olascoaga, 2006; Kleszewski y Hoock, 2007.	White Olascoaga, 2006; Kleszewski y Hoock, 2007.	Kleszewski y Hoock, 2007; Sánchez-Salas <i>et al.</i> , 2006 (posiblemente).	White Olascoaga, 2006; Kleszewski y Hoock, 2007; Sánchez-Salas <i>et al.</i> , 2010	White Olascoaga, 2006; Kleszewski y Hoock, 2007; Zepeda Martínez, 2010;	Kleszewski y Hoock, 2007.
Sistema de apareamiento	Strong y Williamson, 2007; Martínez-Ávalos, 2007	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes
Dinámica de poblaciones	Martínez-Ávalos, 2007; Martínez-Ávalos <i>et al.</i> , 2007	Bravo Espinosa, 2011	No hay reportes	López-Flores y Golubov, 2010; Reza, 2008	Zepeda Martínez, 2010;	No hay reportes
Diversidad genética	Terry <i>et al.</i> , 2006*;	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	Este trabajo
Requerimientos de establecimiento	Muro Pérez, 2011;	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	Zepeda Martínez, 2010;	No hay reportes

Filogenia	Butterworth <i>et al.</i> , 2002; Bárcenas <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Sánchez <i>et al.</i> , 2013	Butterworth <i>et al.</i> , 2002; Bárcenas <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Sánchez <i>et al.</i> , 2013	No hay reportes	Butterworth <i>et al.</i> , 2002; Bárcenas <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Sánchez <i>et al.</i> , 2013	Butterworth <i>et al.</i> , 2002; Bárcenas <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Sánchez <i>et al.</i> , 2013	Bárcenas <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Sánchez <i>et al.</i> , 2013
Método de Evaluación de Riesgo (MER)	Martínez-Ávalos <i>et al.</i> , 2004	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes	No hay reportes

Objetivo General

Estudiar algunos de los aspectos biológicos de *Digitostigma caput-medusae*, para contribuir al diseño de una estrategia integral de conservación.

Objetivos particulares

- 1) 1) Estandarizar el protocolo para amplificar los seis loci de microsatélites de *A. asterias* en *D. caput-medusae*.
- 2) Determinar el número de alelos por locus de dichos microsatélites.
- 3) Explorar el potencial regenerativo *in vitro* de distintos explantes obtenidos a partir de plántulas, tales como ápices y secciones transversales de tallo de *D. caput-medusae* utilizando distintos tratamientos con los reguladores de crecimiento vegetal: BA (bencilaminopurina) y ANA (ácido naftalenacético).
- 4) Explorar el potencial regenerativo y de desarrollo de plántulas de *D. caput-medusae* propagadas por la técnica de injerto para *D. caput-medusae*.
- 5) Describir la morfología y desarrollo de las plántulas de las especies de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma*.
- 6) Describir la secuencia ontogenética de meristemos apicales del tallo dentro de las especies de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma*.

Materiales y Métodos

*Síntesis taxonómica de *Astrophytum**

Género *Astrophytum* Lem.

Cactearum Genera Nova Speciesque Novae 3-6,1839

Plantas globosas a cilíndricas. Tallos aplanados hasta cortamente cilíndricos. Costillas escasas, muy prominentes, con la epidermis provista o no de múltiples y diminutos estigmas, o sea borlas de pelos (tricomas) estrellados, blancos. Espinas ausentes en dos especies; cuando existen, largas, flexibles o rígidas, subuladas. Flores dispuestas en el ápice de la planta, brotando de las aréolas jóvenes, campanuladas hasta cortamente infundibuliformes, de color amarillo con el centro rojizo; pericarpelo con numerosas escamas largas, triangulares y angostas, con la punta escariosa y pungente, cuyas axilas llevan lana abundante: tubo receptacular infundibuliforme, más bien corto, provisto también de lana y escamas triangulares con punta escariosa y base carnosa, más anchas que las anteriores; segmentos del perianto en tres series, lanceolados o ciliados; ovario con óvulos más o menos numerosos, los primarios insertos hasta muy abajo del tubo receptacular; zona nectarial muy pequeña. Fruto globoso, de color amarillo verdoso o rojizo, longitudinalmente dehiscente, en forma de estrella (dehiscencia septifraga), escamoso y más o menos lanoso. Semillas de 2 mm de longitud y 3.5 mm de espesor, con hilo navicular muy grande, de 3 mm de longitud; testa de color castaño oscuro, brillante, lisa.

1.1 *Astrophytum asterias* Zucc. (Lem)

Les Cactées 50, 1868.

Nombre común: Ochitos, cactus estrella, erizo, falso peyote.

Plantas globosas a cortamente cilíndricas, solitarias. Tallo más o menos hemisférico, de unos 5.5 cm de altura y 10 cm de diámetro, sin espinas; epidermis verde grisácea provista de numerosos y diminutos estigmas blancos; ápice hundido, con algo de lana. Costillas 7 u

8, generalmente 8, muy anchas, redondeadas y nada o poco prominentes, de 3 a 3.5 cm de anchura, duras, rectas. Aréolas en el dorso de las costillas, distantes entre sí 4 a 7 mm, prominentes, circulares, de 4 a 5 mm de diámetro, con fieltro blanco, carentes de espinas. Flores próximas al ápice, infundibuliformes, de 3cm de longitud y de 3 a 5 cm de diámetro; pericarpelo globoso, verdoso, con escamas numerosas, angostas, aplanadas, algo carnosas, largamente acuminadas, que llevan en las axilas lana blanca; segmentos exteriores del perianto largamente espatulados, obtusos, de color verde limón, con la franja dorsal verdosa; segmentos interiores del perianto semejantes entre sí, acuminados, de color amarillo limón con la base rojiza; estambres cortos. Pericarpelo y tubo escamosos con axilas lanosas. Fruto alargado-globoso, con escamas largas y delgadas, lanoso; conservando adheridos los restos secos de perianto. Semillas naviculares; testa quebradiza, lisa, brillante, de color castaño negruzco. (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; CONABIO, 2009). Se distribuye en matorrales rosetófilos y matorral tamaulipeco de Texas en EU, y Nuevo León y Tamaulipas en México (CONABIO, 2009). *Astrophytum asterias* se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como endémica y en la categoría En Peligro de Extinción (P) (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como Vulnerable (IUCN, 2013). Aparece en el Apéndice I de CITES (CITES, 2013).



Figura 2. Ejemplar adulto de *Astrophytum asterias*.

1.2 *Astrophytum capricorne* (Dietrich) Britton et Rose

The Cactaceae 3: 184, pl. 21, f. 1. 1922.

Nombre común: *Biznaga algodóncillo*, *biznaga de estropajo*, *peyotillo*.

Plantas globosas a cortamente cilíndricas, solitarias. Tallo subgloboso o cortamente cilíndrico, hasta de 25 cm de altura y cerca de 10cm de diámetro, al principio globoso y después ovoide a alargado. Costillas 7 a 8, altas y agudas, con estigmas blancos, numerosos. Aréolas grandes y distantes, con fieltro castaño. Espinas 6 hasta cerca de 20, algunas gruesas, más o menos aplanadas, suaves, torcidas o recurvadas, de color rojizo, negruzco o ceniciento, largas, de 3 a 10 cm de longitud. Flores de 6 a 7 cm de longitud, que abren ampliamente; segmentos exteriores del perianto rojizos, mucronado; segmentos interiores de color amarillo con la base anaranjado rojiza, espatulados, con el ápice agudo o acuminado. Pericarpelo y tubo escamosos con axilas lanosas. Fruto pequeño, con escamas pungentes y axilas lanosas. Semillas de 2.5 mm de espesor, brillantes (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Se distribuye en los matorrales xerófilos de los estados de Coahuila y Nuevo León (IUCN, 2013). Se encuentra incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como endémica y en la categoría de Amenazada (A) (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como Preocupación menor (IUCN, 2013).



Figura 3. Ejemplar adulto de *Astrophytum capricorne*.

1.3 *Astrophytum coahuilense* (H.Möller) Kaufer

Kakteenfreund 1: 59.1932.

Plantas globosas a ligeramente columnares, solitarias. Tallo solitario, globoso cuando jóvenes, cuando adultos, de columnares a barriles; hasta 65 cm de alto; 20 a 25 cm de diámetro. Epidermis con mechones de tricomas en forma de fieltro que esconden casi completamente el color verde oscuro del tallo. Costillas 5; las aristas de las costillas onduladas. Areolas redondas, 4 mm de diámetro, sobre los crecimientos nuevos aparecen revestidas de lana color café parduzco a grisáceo. En plantas jóvenes la distancia entre areolas de 2 cm; con la edad la distancia puede anularse. Espinas solo presentes en plántulas. Flores amarillas con la garganta de color rojo oscuro a naranja, diámetro de (50-68(-90) mm. Pericarpelo y tubo escamosos con axilas lanosas. La cámara nectarífera tapizada de lana. Fruto madura en cerca de 28 días; es de color rosa o verde oliva y dehiscente inferiormente. Semillas 125(-208) por fruto; forma de gorro, color pardo oscuro. Esta especie comparte el hábitat con *Astrophytum capricorne* var. *senile* aunque no se han encontrado híbridos naturales. Tampoco es viable tener híbridos entre *A. coahuilense* y *A. myriostigma* (Kleszewski y Hooek, 2007). Se distribuye en matorrales xerófilos de los estados de Coahuila y Durango (IUCN, 2013). No se encuentra incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010 por no estar reconocida como especie (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como Vulnerable (IUCN, 2013).



Figura 4. Ejemplar adulto de *Astrophytum coahuilense*.

1.4 *Astrophytum myriostigma* Lem.

Cactearum Genera Nova Speciesque Novae 4,1839.

Nombre común: *Huiznahuac*, bonete o birrete de obispo, mitra.

Plantas globosas a columnares. Tallo simple o cespitoso, globoso a cilíndrico, de 10 a 60 cm de altura y de 10 a 20 cm de diámetro. Costillas generalmente 5 pero en algunas plantas hay 3, 4 a 6 y hasta 8, anchas y más o menos pronunciadas y con aristas desde muy agudas hasta ligeramente redondeadas, con surco bien marcado; superficie cubierta o no de tricomas estrellados, blancos. Aréolas distantes (8 a 15 mm), circulares, 3 mm de diámetro, lanosas. Espinas ausentes. Flor campanulada, de 4 a 6 cm de longitud, color amarillo claro con tinte rojo en el centro; pericarpelo y tubo receptacular con escamas imbricadas, con el ápice escarioso mucronado; axilas lanosas. Fruto globoso-alargado, verde, se abre al madurar en forma de estrella. Semillas naviculares; hilo muy amplio; testa casi negra brillante, de 3 mm de longitud y 2 mm de espesor (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Se distribuye en los matorrales rosetófilos de los estados de San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas (IUCN, 2013). Incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie endémica y en la categoría de Amenazada (A) (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como una especie de Preocupación menor (IUCN, 2013).



Figura 5. Ejemplar adulto de *Astrophytum myriostigma*.

1.5 *Astrophytum ornatum* (DC.) F.A.C. Weber ex Britton et Rose

Cactaceae 3: 185, 1922.

Nombre común: *Huiznahuac*, Biznaga, biznaga de estropajo, piojosa, biznaga de algodoncillo, liendrilla.

Plantas solitarias, subglobosas, cuando cilíndricas, de hasta más de 1m de alto y *ca.* de 30 cm de ancho. *Costillas* 8, agudas, rectas o a veces espiraladas, generalmente con la superficie provista de estigmas cortos. *Aréolas* distantes, de 2 a 3 cm. *Espinas* 5 a 11, amarillas o marrón, lisas, flexibles, de *ca.* 3 cm de longitud, encorvadas o rectas. *Flores* amarillas, infundibuliformes, de 7 a 9 cm de longitud. *Pericarpelo* con escamas angostas y lana corta. *Fruto* semicarnoso, dehiscente desde la base, abriendo como estrella (dehiscencia septífraga), escamoso y algo lanoso. *Semilla* de color castaño oscuro, brillante, de 2.5 mm de longitud y 3.5 mm de espesor; hilo basal, navicular, hundida (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Tomado de Scheinvar, 2004). Se distribuye en el matorral xerófilo de los estados de Querétaro, Hidalgo, Guanajuato y San Luis Potosí (IUCN, 2013). Se encuentra incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie endémica y en la categoría de Amenazada (A) (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como una especie Vulnerable (IUCN, 2013).



Figura 6. Ejemplar adulto de *Astrophytum ornatum*.

Síntesis taxonómica del género Digitostigma

Género ***Digitostigma*** Velazco et Nevárez

Cactáceas y Suculentas Mexicanas 47(4): 79. 2002.

Raíz fusiforme. *Tallo* cortamente cilíndrico, sin costillas, con tubérculos muy largos y delgados que nacen del ápice del tallo; la epidermis está cubierta de estigmas. *Espinas* presentes, no diferenciadas en radiales o centrales; cortas, no completamente rectas, algo onduladas, blanquecinas con la punta de color castaño oscuro. *Aréolas* dimórficas, la espinífera ubicada en el ápice del tubérculo, con lana blanca, circular; areola florífera adaxial en la porción subterminal del tubérculo, sin unión con la areola espinífera. *Flor* originándose en la porción subterminal de los tubérculos en desarrollo, no en el ápice de la planta. Las flores son diurnas, amarillas, con la base de los segmentos interiores del perianto de color rojo a naranja. Segmentos exteriores de color amarillo verdoso, el tubo receptacular presenta escamas lanceoladas, papiráceas, con arista terminal, en cuyas axilas nacen pelos cortos de color blanco; el pericarpelo presenta escamas lanceoladas que también presentan pelos blancos que nacen de las axilas de las escamas. *Fruto* verde y carnoso cuando joven, con escamas lanceoladas y algo de lana que nace de las axilas de las escamas; seco al madurar con dehiscencia longitudinal irregular. *Semillas* grandes (similares a las de *Astrophytum*) de hasta 3 mm de largo, en forma de gorro, de color negro o café oscuro; hilo basal, muy profundo, micrópilo fuera del hilo, pero adyacente (Velazco Macías y Nevárez de los Reyes, 2002).

2. ***Digitostigma caput-medusae*** Velazco y Nevárez

Cactáceas y Suculentas Mexicanas 47(4): 79. 2002.

Nombre común: cabeza de medusa, medusita.

Plantas solitarias a cespitosas, de hasta 19 cm de altura. *Raíz* fusiforme, carnosa. *Tallo* muy reducido, cortamente cilíndrico, sin costillas, con cerdas papiráceas cubriendo el cuello del tallo y su ápice. *Tubérculos* cilíndricos algo triangulares cuando jóvenes, de consistencia cartilaginosa; de 190 mm de largo y 2-3 mm de ancho. *Epidermis* verrugosa, de color verde

glauco, cubierta por estigmas (tricomas peltados escumiformes) de color grisáceo. *Espinas* 0-4, persistentes en tubérculos viejos; 1-3 mm de largo, semirectas, algo duras, blanquecinas con la punta café oscuro. *Areolas*, dimórficas; espiníferas terminales, circulares o elípticas, con lana blanca; floríferas ubicadas en la porción adaxial subterminal, con lana blanca, elípticas, marcadamente más grandes que las espiníferas. *Flor* infundibuliforme de hasta 53 mm de diámetro y 47 de altura; pericarpelo y tubo con escamas lanceoladas y lana en las axilas; segmentos exteriores del perianto oblanceolados, de color amarillo en los bordes, verde claro hacia el centro y en el centro una línea de color café claro a oscuro, la base de los segmentos es de color naranja intenso, márgenes lisos; segmentos interiores oblongos, amarillo intenso, con la base color naranja intenso, márgenes finamente serrados y mucronados; estambres y estilo amarillos. La flor se origina en los tubérculos en desarrollo no en el ápice de la planta. *Fruto* ovoide, de hasta 20 mm de largo y 8 mm de ancho, carnosos y de color verde cuando joven con escamas que presentan lana en las axilas; restos de perianto no persistentes, dehiscencia irregular longitudinal. *Semillas* grandes, de hasta 3 mm de largo, 2.5 a 3 mm de alto y 2 mm de ancho, negras, café oscuro hacia la base del hilo, brillantes, en forma de gorro, testa verrucosa en la parte superior, engrosándose las ornamentaciones hacia el área del hilo, testa ensanchada hacia la base formando dos abultamientos que sobresalen sobre los márgenes en la forma frontal y micropilar, siendo el frontal más grande que el micropilar, ambos abultamientos con forma ovado-rectangular (Velazco Macías y Nevárez de los Reyes, 2002). Se distribuye en matorral tamaulipeco al norte del estado de Nuevo León (IUCN, 2013). Incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie endémica y en la categoría de En Peligro de Extinción (P) (SEMARNAT, 2010). Mientras que la IUCN la coloca como una especie Críticamente amenazada (IUCN, 2013).



Figura 7. Ejemplar adulto de *Digitostigma caput-medusae*.

Cuadro 2. Síntesis de información ecológica y situación de amenaza de las especies del género *Astrophytum* y *Digitostigma caput-medusae* (White Olascoaga, 2006; SEMARNAT, 2010; CITES, 2013; IUCN, 2013)

Categoría de riesgo	<i>A. asterias</i>	<i>A. capricorne</i>	<i>A. coahuilense</i>	<i>A. myriostigma</i>	<i>A. ornatum</i>	<i>D. caput-medusae</i>
NOM-059-SEMARNAT-2010	En Peligro de Extinción (P)	Amenazada (A)	No reconocido como especie y no incluido	Amenazada (A)	Amenazada (A)	En Peligro de Extinción (P)
IUCN Lista Roja, 2013	Vulnerable	Preocupación menor	Vulnerable	Preocupación menor	Vulnerable	Criticamente amenazada
CITES, 2013	Apéndice I	Apéndice II	Situación incierta	Apéndice II	Apéndice II	Apéndice II
Distribución	Texas (EUA); Tamaulipas y Nuevo León (MEX)	Coahuila, Nuevo León	Coahuila y Durango	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí	San Luis Potosí, Hidalgo y Guanajuato	Nuevo León
Tipo de vegetación	Matorral tamaulipeco	Matorrales rosetófilos principalmente	Matorrales xerófilos	Matorrales xerófilos de varios tipos	Matorrales xerófilos	Matorral tamaulipeco
Tipo de suelo	Calizos	Calizos	Calizos	Calizos	Calizos	Aparentemente suelos tipo Rendzina
Altitud (msnm)	190-700	650-1700	1092	710-1900	850-2100	160

Avances para la evaluación de la diversidad genética en *Digitostigma caput-medusae* (Cactaceae), una especie en peligro de extinción y endémica del noreste de México

Resumen

Digitostigma caput-medusae es una especie poco estudiada y gravemente amenazada de extinción. La población original de *D. caput-medusae* ha sido reducida dramáticamente a 11 años de su descubrimiento debido al cambio de uso de suelo y la colecta ilegal de ejemplares, principalmente. Se evaluó la diversidad genética de 17 ejemplares silvestres y propagados provenientes de dos colecciones botánicas, esto se hizo utilizando seis loci de microsatélites diseñados para *Astrophytum asterias*. Sólo dos de los seis microsatélites resultaron presentes en las muestras de *D. caput-medusae*, mostrando un total de 14 alelos, 8 ejemplares heterocigos para uno de los dos loci, 8 clones y sólo uno de los ejemplares resultó heterocigo para ambos loci. Por los resultados, es posible proponer que todos los ejemplares analizados podrían tener su procedencia en la única población original y al menos 8 podrían ser clones. Se comprueba parcialmente, el parentesco cercano que existe entre el género *Digitostigma* y *Astrophytum* por compartir, al menos dos loci de microsatélites.

Introducción

Digitostigma caput-medusae (medusita) es un taxón de la familia Cactaceae poco estudiado y microendémico del estado de Nuevo León (Velasco Macías y Nevárez de los Reyes, 2002; Hernández-Alva *et al.*, 2011). Solo se conoce una población de *D. caput-medusae* localizada al centro del estado de Nuevo León, donde en 2001 se registraron 129 individuos dentro de un área de más de 1 km². Posteriormente, en el año 2009 solo se encontraron cuatro individuos en la misma área; esta reducción de la población se debió, principalmente, a la colecta ilegal y al cambio de uso de suelo (CONABIO, 2010; Hernández-Alva *et al.*, 2011). Actualmente, esta especie se encuentra incluida en la categoría En peligro de extinción dentro de la lista de especies amenazadas de México (NOM-059-SEMARNAT-2010) y a nivel internacional se le considera como Críticamente amenazada por la Lista Roja de la IUCN (Velasco Macías y Nevárez de los Reyes, 2002; SEMARNAT, 2010; IUCN, 2013).

En las colecciones botánicas nacionales la especie *D. caput-medusae* tiene poca representación, sin embargo, existen algunos ejemplares silvestres que se han resguardado y propagado con éxito tanto en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM

como en la UMA “Proyecto *Digitostigma*”; dichos ejemplares podrían otorgar datos relevantes sobre la diversidad genética del taxón utilizando microsatélites como marcadores moleculares, pues ya no es posible evaluar a la población en medio silvestre (CONABIO, 2010; Hernández-Alva *et al.*, 2011).

Desde los trabajos de Otero-Arnaiz (2004; 2005), los estudios dentro de la familia Cactaceae utilizando microsatélites han sido cada vez más frecuentes (Hughes *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2006; Arakaki *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2010). Terry y colaboradores (2006), caracterizaron seis loci de microsatélites en *Astrophytum asterias* dentro de poblaciones del condado de Starr en Texas, Estados Unidos. Con ese último trabajo no solo se aportaron datos sobre la diversidad genética de *A. asterias* sino que se contribuyó para el inicio de otros estudios con especies del mismo género y con otros géneros relacionados como *Digitostigma* (Hunt, 2003a; Hunt, 2003b; Hunt, 2005; Kiesling, 2007; Bárcenas *et al.*, 2011; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013).

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Estandarizar el protocolo para amplificar los seis loci de microsatélites de *A. asterias* en *D. caput-medusae*. 2) Determinar el número de alelos por locus de dichos microsatélites.

Materiales y Métodos

En agosto de 2010 se tomaron las muestras de tubérculos (2 cm x 2 cm) de 15 diferentes plantas de la UMA “Proyecto *Digitostigma*” del Biól. Manuel Nevárez de los Reyes ubicada en la localidad de Escobedo, N.L. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico tipo Ziploc® llenas con sílica gel para su deshidratación y a cada una se le asignó un código para su transportación al Instituto de Biología de la UNAM. Lo mismo se hizo con 2 individuos de la Colección de Investigación de Cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Las 17 muestras totales se clasificaron como indica el Cuadro 3. Las muestras provenientes de la UMA “Proyecto *Digitostigma*” se tomaron de cinco individuos silvestres colectados entre los años 2003 y 2008 y que se encontraban creciendo sobre sus propias raíces (Ind. #0 al Wild 2). Además, se tomaron diez muestras más de individuos injertados sin etiquetas de procedencia y que se presume fueron clones de las otras seis plantas silvestres originales o cruza entre esas mismas (Clon 2 al Ind. I).

Las dos muestras provenientes de la Colección de Investigación de Cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM se obtuvieron de ejemplares colectados en el año 2009 y que también crecían sobre sus propias raíces (1862-SA-1 y 1862-SA-2). También se incluyó una muestra de tejido de un ejemplar propagado de *A. asterias* como control positivo de la amplificación de los microsatélites durante la fase de estandarización (Aa01).

Cuadro 3. Claves e identificación de las muestras de 17 individuos de *D. caput-medusae* provenientes de la UMA “Proyecto *Digitostigma*” y de la Colección de Investigación de Cactáceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Utilizadas para amplificar los seis loci de microsatélites publicados por Terry *et al.* (2006). Incluyendo un control positivo de *A. asterias*.

Clave de muestras para análisis moleculares	Datos de colecta	Fecha de colecta	Observaciones
Extracción 1	Ind. #0 original*. Colecta 2003	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 2	Ind. #1 original*. Colecta 2003	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 3	Ind. #2 original*. Colecta 2003	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 4	Wild 1 colecta mayo 2008*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 5	Wild 2 colecta mayo 2008*	16-Agosto 2010	En sus propias raíces
Ext. 6	Clon 2, colecta mayo 2008*	16-Agosto 2010	En sus propias raíces
Ext. 7	Ind. A*	16-Agosto 2010	Posible cruza, Injerto
Ext. 8	Ind. B*	16-Agosto 2010	Posible cruza, Injerto
Ext. 9	Ind. C*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 10	Ind. D*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 11	Ind. E*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 12	Ind. F*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 13	Ind. G*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 14	Ind. H*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 15	Ind. I*	16-Agosto 2010	Injerto
Ext. 16	1862-SA-1	20-Agosto 2010	En sus propias raíces
Ext. 17	1862-SA-2	20-Agosto 2010	En sus propias raíces
Ext. 18	Aa01 <i>Astrophytum asterias</i> , propagada de colecciones del JB-IBUNAM	18-Enero-2011	En sus propias raíces

En septiembre de 2010, se realizó la extracción de ADN usando el protocolo y materiales del Kit DNeasy Plant Mini de QIAGEN®. Se utilizó el tejido previamente

deshidratado en silica gel, se tomó el 50% del volumen de las muestras y se congelaron a temperatura crítica (-70°C) con un ultracongelador Thermo® Forma -86C ULT Freezer. Se evaluó la presencia y concentración indirecta del ADN por separación electroforética con 7 µl de muestra en un gel de agarosa al 2% + bromuro de etidio a 100V durante 15 min en Buffer TBE 1X. No se pudo cuantificar por espectrofotometría en el espectrofotómetro GeneQuant Amersham Biosciences debido a la baja concentración de ADN de las extracciones.

La estandarización del protocolo de PCR para la amplificación de los seis loci de microsatélites dentro de las 17 muestras y el control positivo se realizó con los primers no marcados de *Astrophytum asterias* (Terry *et al.*, 2006). Los datos de los loci de microsatélites antes mencionados se reproducen según su publicación en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Loci de microsatélites de *A. asterias*. Mostrando nombre del locus, el número de accesoión del GenBank, motivo repetido, secuencias forward y reverse de los primers, rango de tamaño del amplicon (en pares de bases), número de alelos detectados (N_A), etiqueta fluorescente de identidad en la región 5' terminal del primer forward, temperatura de desnaturalizante predicha (sales ajustadas), y heterocigosidad esperada y observada (H_E y H_O). Tomado de Terry *et al.*, (2006).

Nombre del Locus	No. de Accesion GeneBank	Motivo repetido	Secuencia del primer (5'-3')	N_A	Rango	Marcador fluorescente	Temperatura desnaturalizante	H_E/H_O
<i>AaB6</i>	DQ314549	(GA) ₁₃	CATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG ACTCAGGAAAGACTTACACCATGG	7	83-99	HEX	64 °C	0.577, 0.564
<i>AaH11</i>	DQ314550	(CA) ₁₇	GAAGAAACACTTCTGCAAGTAGATG GATTTCCATCACCATCTTGTCAGC	13	83-109	FAM	63 °C	0.863, 0.670
<i>AaA3</i>	DQ314551	(AAG) ₁₃	GCAAGCAAGAGTATGGTGAATTGG AGTTATTTTCACGGTAACACACATGG	10	138-168	FAM	64 °C	0.623, 0.649
<i>AaC3</i>	DQ314552	(GA) ₁₂	AACTAATATCATGCTGCGTCGTTAG ACGGTCCAGTCACATAACATTCC	11	88-108	FAM	63 °C	0.759, 0.670
<i>AaD9</i>	DQ314553	(AG) ₁₀	CTGTTTAGTTCTCTCGTCTTCACC CTCCGCTTTTACTGCTAGCACC	6	135-143	HEX	64 °C	0.332, 0.309
<i>AaG3</i>	DQ314554	(CA) ₇	CTAACAGAGAATCCAAGGCTTTTCC AATCGCCAGCCGAGGGAGAC	4	127-133	HEX	64 °C	0.638, 0.723

Se utilizó el Kit Multiplex PCR de QIAGEN® y un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems®, con los siguientes componentes: 7.5 µl de MasterMix, 1.5 µl de solución Q, 1.5 µL de ambos primers, 2.0 µl de H2O destilada y 2.0 µl de la muestra de ADN. Se utilizaron los programas de termociclador recomendados por Terry y colaboradores (2006) y los recomendados por QIAGEN® en el manual del kit. Los

productos se visualizaron con gel de agarosa 2% a 100 volts por 15 min. Una vez detectados los microsatélites *AaH11* y *AaB6* como amplificación positiva en las 17 muestras de *D. caput-medusae*, se procedió a trabajar con los primers marcados con los colores fluorescentes HEX (verde) y FAM (azul), respectivamente. Esto se hizo para poder realizar la secuenciación directa de los productos de PCR en el Secuenciador ABI 3100 DNA Sequencer® utilizando un size standard GS350ROX como referencia.

Los resultados de la secuenciación se visualizaron con el programa GeneMapper® Software (versión 3.7) de Applied Biosystems y con esto se determinó el tamaño final de los alelos y heterocigosidad en las muestras de cada individuo. El promedio del número de alelos por locus fueron determinados con los software gratuitos GenAEx Ver. 6.41 y Arlequin ver. 3.51.2 (ambos software se encuentran disponibles en la web en las direcciones <http://biology.anu.edu.au/GenAEx/Welcome.html> y <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>, respectivamente).

La heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e) de acuerdo a Levene (1949) se estimaron usando el programa Arlequin (Yeh y Boyle, 1997; Goldstein y Schlötterer, 1999). El coeficiente de endogamia (F_{is}) no pudo ser obtenido por datos insuficientes y por tener una sola población.

Resultados

La extracción de ADN de las 17 muestras de individuos de la especie *D. caput-medusae* por medio de la implementación del Kit DNeasy Plant Mini de QIAGEN® fue exitosa y se evaluó la concentración indirecta del mismo por medio de electroforesis en gel de agarosa 2% (Fig. 9).

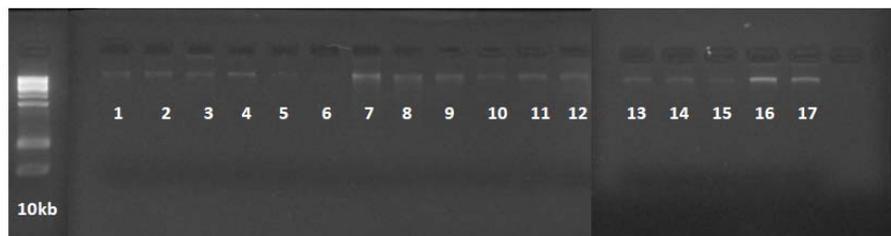


Fig. 8. Extracciones de ADN de los 15 individuos provenientes de la UMA “Proyecto Digitostigma” y 2 individuos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM en gel de agarosa 2%. Los números debajo de cada carril siguen la clave de muestras para análisis moleculares antes mencionada.

Se procedió entonces a amplificar los primers B6, H11, A3, D9, G3 y C3 a las temperaturas de anillamiento indicadas por Terry y cols. (2006) para su visualización en gel de agarosa al 2% y tras varios intentos se pudo amplificar el primer B6 en mayo de 2011. Posteriormente, se obtuvo la amplificación del microsatélite *AaH11*. La escalera de referencia utilizada fue de 10bp (Fig. 9 y 10).

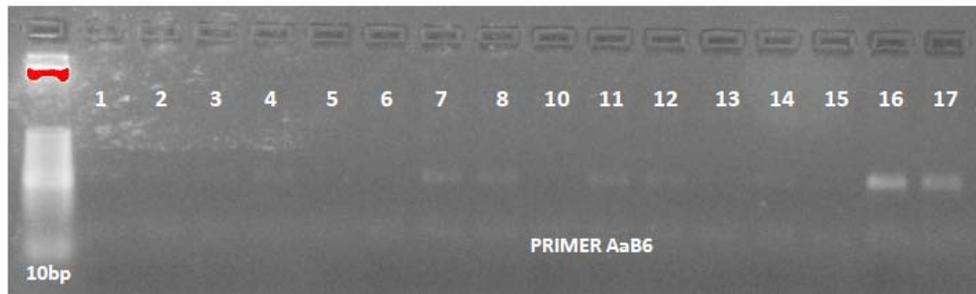


Fig. 9. Amplificación del primer *AaB6*, con muestras de ADN de los 15 individuos de la UMA “Proyecto Digitostigma” (# de muestra del 1 al 15) y 2 individuos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM (# de muestra 16 y 17) en gel de agarosa 2%.

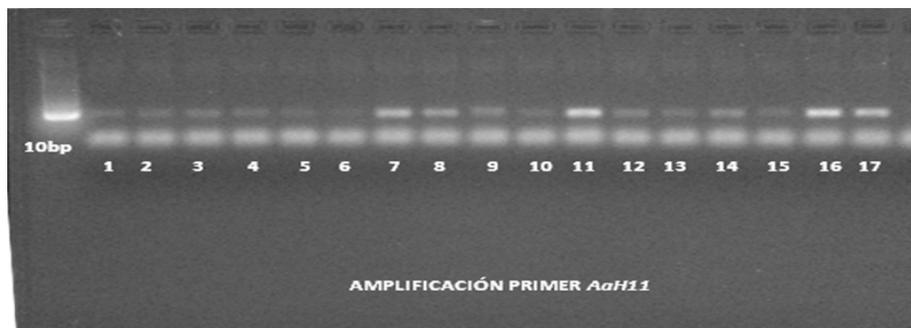


Fig. 10. Amplificación del primer *AaH11*, con muestras de ADN de los 15 individuos de la UMA “Proyecto Digitostigma” (# de muestra del 1 al 15) y 2 individuos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM (# de muestra 16 y 17) en gel de agarosa 2%.

La amplificación de los microsatélites *AaB6* y *AaH11* fue positiva, por lo cual, se procedió a la “secuenciación” directa de los productos del PCR con los primer marcados con el marcador FAM y HEX, respectivamente. Los resultados son presentados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Microsatélites seleccionados por amplificación positiva (*AaB6* y *AaH11*). Amplificando en las 17 muestras de *D. caput-medusae* provenientes de 15 individuos de la UMA “Proyecto Digitostigma” (# de muestra del 1 al 15) y 2 individuos adultos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM. Los encabezados indican nombre del locus, el número de accesión del GenBank, motivo repetido, secuencias forward y reverse de los primers, rango de tamaño del amplicon (en pares de bases), número de alelos detectados (N_A), etiqueta fluorescente de identidad en la región 5' terminal del primer forward, temperatura de desnaturalizante predicha (sales ajustadas), y heterocigosidad esperada y observada (H_E y H_O).

Locus	No. de Accesion GeneBank	Motivo repetido	Secuencia del primer (5'-3')	N_A	Rango	Marcador fluorescente	Temperatura desnaturalizante	H_E/H_O
<i>AaB6</i>	DQ314549	(GA) ₁₃	CATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG ACTCAGGAAAAGACTTACCCATGG	9	113-125	FAM	64 °C	0.774, 0.118
<i>AaH11</i>	DQ314550	(CA) ₁₇	GAAGAAACACTTCTGCAAGTAGATG GATTTCCATCACCATCTTGTCAGC	5	78-93	HEX	63 °C	0.413, 0.412

De los seis loci de *A. asterias*, sólo se tuvo la amplificación positiva para dos (*AaB6* y *AaH11*) con un total de 14 alelos. El número de alelos para el microsatélite *AaB6* fue 9, mientras que para *AaH11* fue de 5. No más de dos alelos por individuo fueron detectados, lo que sugiere la presencia de individuos diploides. Se encontró que el microsatélite *AaB6* fue el más rico en alelos (con 9 alelos) y tuvo los valores más altos de heterocigosidad ($H_E=0.774$ y $H_O=0.118$). Por otro lado, el locus *AaH11* fue el más pobre en alelos (con 5) y tuvo los valores más bajo de heterocigosidad ($H_E= 0.413$ y $H_O=0.412$). Para mayor detalle, consultar el Apéndice 1.

Discusión

Ambos loci tuvieron una cantidad considerable de alelos (14 alelos en 17 individuos), sobre todo si se compara con la especie de referencia *Astrophytum asterias* (51 alelos en 96 individuos), la cual, también podría ser la especie más cercana a *D. caput-medusae* según apuntan los estudios más recientes de la filogenia en la tribu Cactaeae (Terry *et al.*, 2006; Bárcenas *et al.*, 2011; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013).

Terry y colaboradores (2006), trabajaron con 96 individuos de *Astrophytum asterias* en las poblaciones de Texas (EUA), ellos utilizaron 6 loci y pudieron encontrar 51 alelos. Entre los seis loci probados en dicho estudio, el de mayor número de alelos fue *AaH11* (13 alelos). Fue ese mismo locus el que apareció en las muestra de *D. caput-medusae* con 5 alelos y eso se explica porque los microsatélites son secuencias homólogas específicas para diferentes especies o géneros (Goldstein *et al.*, 1996). Cabe señalar que los dos loci (*AaB6*

y *AaH11*) mostraron una cantidad de alelos muy parecida a los encontrados para 8 loci dentro de 23 individuos en la especie también endémica y amenazada llamada *Ariocarpus bravoanus* (Hughes *et al.*, 2008).

Los valores promedio de H_E y H_O para los dos loci encontrados entre los individuos *D. caput-medusae* fueron 0.593 y 0.265, respectivamente. Ambos valores por debajo de los valores promedio reportados en los trabajos de Terry *et al.* (2006) y Parra *et al.* (2010). Esto podría indicar que lo que resta de la población original de *D. caput-medusae* tenía poca variación genética y podría presentar un riesgo alto de generar entrecruzamientos entre individuos emparentados y homocigos, disminuyendo así la frecuencia de los individuos heterocigos.

En especies como éstas, el riesgo de extinción no siempre es alto, pues existen los fenómenos de *purga* que se encarga de eliminar alelos recesivos deletéreos (Rocha y Gasca, 2007). Por otro lado, en estas especies también se presentan problemas con la adecuación (depresión por endogamia), bajos porcentajes de germinación y supervivencia, así como alta mortalidad debida a cambios ambientales (Rocha y Gasca, 2007). Ambas posibilidades pueden tener lugar en el caso de *D. caput-medusae* pero aún se requieren más estudios.

Con la reducción de ejemplares con capacidad de autofecundarse de manera cruzada podría surgir el riesgo de que las plantas puedan autofecundarse aún dentro de las mismas flores de un solo individuo. En este sentido, la experiencia con el cultivo de los ejemplares de *D. caput-medusae* indica que la autofecundación puede presentarse, quizá en bajo porcentaje, pero se puede presentar (Antonio Díaz y Nevárez de los Reyes, comunicación personal). Con este sistema de apareamiento, lo que se podría esperar es que de manera natural incremente el número de individuos homocigos, conduciendo a endogamia. Lo que aún se desconoce son las condiciones de la autofecundación, es decir, si se presenta cuando el estigma de una flor acepta su propio polen o acepta el polen de otra flor. En este caso podríamos estar ante una especie que tienen un sistema de apareamiento mixto, se autofecunda con poca frecuencia y en la mayoría de los casos es necesaria la fecundación con plantas diferentes. Si comparamos al sistema de apareamiento de *D. caput-medusae* con el descrito para las poblaciones de *Astrophytum asterias* podremos ver que la segunda especie tiene un sistema de apareamiento que no permite la autofecundación ni dentro de la misma flor ni entre flores de un solo individuo, es decir, *A. asterias* es una especie de

polinización cruzada exclusiva y obligada en las poblaciones de Texas (Strong y Williamson, 2007). Sin embargo, Martínez Ávalos (2007), mostró que las plantas de las poblaciones mexicanas de *A. asterias* son xenógamas facultativas, esto quiere decir que pueden ser autocompatibles bajo determinadas condiciones de polinizadores.

Resulta prioritario distinguir a los ejemplares con mayor diversidad en cuanto a alelos se refiere, para priorizar su protección y reproducción. Para el locus *AaH11* hubo 7 individuos heterocigos. Para el locus *AaB6* fueron identificados solo dos individuos heterocigos (ver Apéndice 1). En tanto que, para ambos loci hubo solo un individuo heterocigo (ver Apéndice 1). Por lo que respecta a los individuos restantes, dominaron dos alelos, uno ocupando el 76% en el locus *AaH11* y otro ocupando el 44% en el locus *AaB6*. Es probable que 7 de los 15 ejemplares muestreados en la UMA “Proyecto Digitostigma” sean diferentes genéticamente, pero al menos 8 podrían ser clones de los 5 individuos originales o cruza de estos, lo que resulta extraño y no se puede explicar la fuente de variación en estos ejemplares a menor que se trate de plantas propagadas a partir de semillas procedentes de la población silvestre. En lo que respecta a los 2 individuos adultos de la Colección de Investigación de Cactáceas del JB-IBUNAM se encontraron presentes los mismos alelos que en los ejemplares de la UMA “Proyecto Digitostigma”, lo que hace suponer que en su momento, todos los individuos compartieron el espacio en la misma localidad.

Conclusiones

Se encontró evidencia *Digitostigma caput-medusae* y *Astrophytum asterias* están estrechamente relacionados filogenéticamente por el hecho de compartir dos loci en común (*AaB6* y *AaH11*) y esto está sustentado por los resultados recientes de Vázquez-Sánchez *et al.* (2013) que colocan a *D. caput-medusae* como una especie del género *Astrophytum*. Es probable que siete de los 15 ejemplares muestreados en la UMA “Proyecto Digitostigma” sean diferentes genéticamente, pero al menos 8 podrían ser clones de los 5 individuos originales. Sólo uno de los individuos resultó heterocigo para los dos loci de microsatélites.

Cultivo *in vitro* e injerto en *Digitostigma caput-medusae* (Cactaceae), técnicas complementarias para su conservación

Resumen

El cultivo *in vitro* y la técnica del injerto son dos opciones complementarias que se han practicado en una gran cantidad de especies amenazadas de la familia Cactaceae, acelerando su reproducción y desarrollo, contribuyendo así a la conservación *ex e in situ*. Cerca de 30 plántulas de *D. caput-medusae* fueron cultivadas *in vitro* en medio MS 50%. Se realizaron cortes transversales y longitudinales a la región del hipocótilo de las plántulas y se les aplicaron dos juegos de tratamientos hormonales con los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) BA y ANA. Las distintas secciones de plántulas de *D. caput-medusae* produjeron abundante callo en concentraciones altas de citocinina (AB) de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L y bajas de auxina (ANA) de 0.0, 0.1 y 0.5 mg/L en sus diferentes combinaciones. Las concentraciones de 1.0 mg/L BA+0.5 mg/L ANA y 1.0 mg/L BA+0.0 mg/L ANA indujeron la formación de brotes con tubérculos hipertrofiados después de dos y tres meses de cultivo en el medio de inducción, respectivamente. Los brotes obtenidos *in vitro* no resistieron el proceso de aclimatización y murieron a las pocas horas de ser expuestos a condiciones *ex vitro*, por lo que es necesario consolidar y deshidratar los explantes antes de iniciar la aclimatización. El injerto de plántulas de *D. caput-medusae* de 8 meses de edad sobre plántulas de 15 cm de alto y 3 años de edad de *Ferocactus cylindraceus* mostró que las plantas pueden tener un desarrollo más rápido que el que pueden lograr en sus propias raíces, es decir, dos meses después de ser injertadas ya tenían nuevos brotes y después de tres meses ya habían desarrollado los tubérculos con areolas dimórficas maduras y flores viables y normales. Las ventajas de ambas técnicas potencialmente pueden compensar sus propias desventajas y reducir los tiempos de producción de plantas con algún estatus de amenaza, contribuyendo así, a su conservación *ex situ*.

Introducción

El tipo de reproducción de las cactáceas abarca tanto la reproducción sexual como la asexual. Sin embargo, es difícil su conservación debido a los porcentajes bajos de germinación, escaso reclutamiento de individuos jóvenes en poblaciones naturales y a una baja tasa de crecimiento en la gran mayoría de las especies. Ejemplos de las problemáticas antes mencionadas se encuentran en las poblaciones de *Strombocactus disciformis*, *Turbincarpus pseudomacrolele*, *Astrophytum asterias*, *Lophophora williamsii* y *Pelecypora aselliformis* (Álvarez *et al.*, 2004; Terry, 2005; Marinelli, 2006; Terry *et al.*, 2006; Martínez-Ávalos *et al.*, 2007).

El cultivo *in vitro* se ha practicado en una gran cantidad de especies de la familia Cactaceae para su conservación y para acelerar su reproducción y desarrollo, con resultados que van desde la brotación múltiple por regeneración directa e indirecta (Hubstenberger *et*

al., 1992; Chávez y Rubluo, 1995; Malda *et al.*, 1998; Estrada-Luna *et al.*, 2002; Rubluo *et al.*, 2002; Calderón-Gil, 2007; Cardarelli *et al.*, 2010) hasta la inducción de embriogénesis somática (Leng y Keng, 2007). Entre las especies de cactáceas que se han regenerando y/o propagado por medio de esta técnica se encuentran *Aztekium ritteri*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus*, *Astrophytum asterias*, *Astrophytum myriostigma*, *Coryphantha elephantidens*, *Mammillaria albicoma*, *Mammillaria guelzowiana*, *Mammillaria woodsii*, *Opuntia ellisiana*, *Pelecyphora aselliformis*, *Pelecyphora strobiliformis*, *Turbincarpus laui* y *Turbincarpus pseudopectinatus*, por citar algunas y cabe señalar que la mayoría son endémicos de México (Hubstenberger *et al.*, 1992; Stuppy y Nagl, 1992; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1998; Singh Bhau, 1999; Mata Rosas *et al.*, 2001; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Wyka *et al.*, 2006; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007; Garza- Padrón, 2010). Sin embargo, sólo pocos ejemplos pueden mencionarse que hayan llegado a las últimas etapas de establecimiento *ex vitro*, producción a gran escala y reintroducción (Ejemplos: *Mammillaria san-angelensis* y *M. mathildae*; Rubluo *et al.*, 2002; García-Rubio y Malda-Barrera, 2010).

El cultivo *in vitro* (CTV) puede operar siguiendo varias vías que van desde la organogénesis directa o indirecta e incluso la embriogénesis somática (Leng y Keng, 2007), pero siempre bajo tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como auxinas y citocininas a diferentes concentraciones para inducir la respuesta deseada (Cuadro 6). Respectivamente el ácido naftalenacético (ANA) y la benciladenina (BA o BAP) se encuentran entre los RCV más utilizados en los procesos de inducción morfogénica (regenerativa), las concentraciones efectivas más reportadas son ANA: 0,0.5,1 mg/L combinadas con BA 1,2,3 mg/L, con un período de inducción (tiempo en presencia de los RCV) entre 1-3 meses. Durante este período se ha reportado las respuestas morfogénicas. Posteriormente, los explantes y/o regenerantes son subcultivados a medio basal sin RCV. El medio de cultivo más ampliamente utilizado para CTV es el de Murashige y Skoog (MS) (1962) utilizado al 100% o al 50% de su concentración. Un procedimiento cada vez más practicado es permitir el “envejecimiento” del medio de cultivo, lo cual lleva a la deshidratación del medio que se asocia a una conformación más normal de los regenerantes, al consolidarse sin pasar por una condición de hiperhidratación o al revertir esta última. La individualización de los regenerantes (brotes) es una fase que

debe ser realizada cuando los brotes cuentan con una talla mayor a 3 o 5 mm altura y al tiempo de colocarlos en medio fresco no deben “enterrarse” (introducirse más de 2 mm en el medio) sino colocarse de tal manera que solo queden fijados al medio de cultivo, de otra manera se puede presentar la formación de callo. El enraizamiento de esos brotes puede ocurrir de manera espontánea sin la adición de auxinas. Es posible que la aplicación de carbón activado (0.5-1.5 g/L) ayude al enraizamiento (González Caballero, 2008).

Cuadro 6. Ejemplos de especies de la familia Cactaceae propagadas por cultivo *in vitro*. Categorías de riesgo de extinción, medios de cultivo, tipos de explante utilizados, reguladores de crecimiento empleados, tipo de respuesta inducida y autores de los trabajos. BA=Benciladenina, ANA=Ácido naftalenacético, KIN=Cinetina, 2,4-D=2,4 diclorofenoxiacético, ATIB=Ácido 2,3,5-triyodobenzóico.

Espece	Categoría	Medio de cultivo	Explante	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Respuesta <i>in vitro</i>	Referencia
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	MS 50%	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	2.4 BA /1.1 ANA 1.6-4 BA /0.1-1.1 ANA 5 KIN sola y con 0.1 2,4-D	Brotos, embriones somáticos, callo compacto	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>Ariocarpus retusus</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	MS y SH 20% (v/v) agua de coco	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	-	Callo, embriones somáticos	Stuppy y Nagl, 1992
<i>Leuchtenbergia principis</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	1.0 BA/ 0.1 ANA	Brotos	Starling, 1985
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	2mg/L (BA) y 3 mg/L (2,4-D); 3mg/L de 2,4-D; 2mg/L de BA	Callo	Garza-Padrón <i>et al.</i> , 2010
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	MS	Segmentos de plántulas de 2-3 años de edad en invernadero	1 BA + 0.01 ANA	Callo compacto, brotes	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Astrophytum ornatum</i>	Vulnerable (IUCN, 2013)	MS	Explantes apicales y laterales de plántulas	1.0 y 2.0 BA + 2.0 ANA	Activación areolar	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002

<i>Astrophytum ornatum</i>	Vulnerable (IUCN, 2013)	MS	Explantes apicales y laterales de plántulas	0.0, 1.0 y 2.0 BA ó KIN + 0.0, 1.0 y 2.0 ANA ó 2,4-D	Callo compacto, brotes	Mendoza Madrigal, 2007
<i>Astrophytum capricorne</i>	Preocupación menor (IUCN, 2013)	No determinado	Meristemo apical	3.0 BA + 0.2 2,4-D	Brotes	Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 2004
<i>Astrophytum asterias</i>	Vulnerable (IUCN, 2013)	No determinado	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0.5 BA + 1.0 ATIB	Activación areolar	Lizalde-Viramontes et al., 2004

La aplicación del cultivo *in vitro* se justifica en especies que se propagan vegetativamente, en aquellas especies que producen semillas recalcitrantes como la mayor parte de los frutos tropicales y en algunos taxones que presentan dificultades para su producción por medio de semillas. Así mismo, el cultivo *in vitro* tiene diversas ventajas con respecto a las técnicas de propagación tradicional, pues permite una rápida multiplicación de la especie en espacio reducidos, se pueden obtener ejemplares libres de agentes patógenos y se tiene un mayor rendimiento al producir un gran número de brotes a partir de pequeñas cantidades de material inicial (Fay, 1994; Chávez y Rubluo, 1995).

Por otro lado, las técnicas tradicionales de propagación en cactáceas incluyen una gran gama de posibilidades que van desde aquellas que exploran la vía sexual y asexual de reproducción. Dentro de la vía sexual solo se encuentra la germinación de semillas, común en la mayoría de los viveros comerciales (Reyes Santiago, 2009). La vía asexual de propagación es más barata, rápida y sencilla de aplicar en todo tipo de viveros comerciales e incluye la obtención de clones por medio de los esquejes, brotes y la técnica del injerto (Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Reyes Santiago, 2009; Flores Pérez, 2009). En el caso de las técnicas tradicionales, en investigación científica solo son aplicadas en estudios de germinación y evaluaciones fisiológicas en algunos casos; (Malda *et al.*, 1998; Bautista-Alvarado, 2007; Navarro y Deméneghi, 2007; Flores Pérez, 2009; Flores *et al.*, 2011).

El injerto es una técnica ancestral china que se basa en la unión artificial de porciones de dos plantas distintas, para ayudar a aquellas que tienen dificultad para vivir directamente en el suelo y también es útil para propagar especies en peligro extinción, ya que se puede acelerar su crecimiento y desarrollo (Estrada Luna *et al.*, 2002; Harman y

Kester, 2002; Flores Pérez, 2009; Puente Alarcón, 2009). De las partes a unir, a una se le llama injerto; el cual se inserta en el tallo de la otra planta, denominada patrón o porta injerto y que se convierte en su soporte y le proporciona los nutrientes necesarios para su crecimiento, de tal manera que se logra una íntima conexión entre ambas partes por medio de la regeneración de tejidos de conducción, funcionando el conjunto como un solo individuo (Anderson, 1997). Esta técnica de propagación comercial se ve restringida por su bajo éxito, dificultades de uso de las técnicas poco confiables y por los problemas de contaminación por bacterias y hongos y deshidratación excesiva de los tejidos en el área de unión (Estrada Luna *et al.*, 2002). Los ejemplos más significativos son los cultivos comerciales de plantas llamativas como *Gymnocalycium mihanovichii*, cultivares de *Astrophytum* y otras plantas crestadas y variegadas (Arévalo, 2000; Estrada Luna *et al.*, 2002; Flores Pérez, 2009).

Digitostigma caput-medusae es una especie microendémica y seriamente amenazada de extinción cuya distribución original corresponde a la región centro del estado de Nuevo León, México (Velasco Macías y Nevárez de los Reyes, 2002; CONABIO, 2010; Hernández-Alva *et al.*, 2011; IUCN, 2013). Este taxón no se encuentra bien representado en las colecciones de los jardines botánicos a nivel nacional, tiene baja producción de semillas y poca o nula información biológica. El género más cercano taxonómicamente a este taxón es el género *Astrophytum* que ya ha sido trabajado en abundancia tanto por cultivo *in vitro* como en injerto (Cuadro 6) (Flores Pérez, 2009; Bárcenas *et al.*, 2011; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Explorar el potencial regenerativo *in vitro* de distintos explantes obtenidos a partir de plántulas, tales como ápices y secciones transversales de tallo de *D. caput-medusae* utilizando distintos tratamientos con los reguladores de crecimiento vegetal: BA (bencil-aminopurina) y ANA (ácido naftalenacético). 2) Explorar el potencial regenerativo y de desarrollo de plántulas de *D. caput-medusae* propagadas por la técnica de injerto para *D. caput-medusae*.

Materiales y Métodos

Entre los meses de septiembre de 2009 y mayo de 2010 se recibieron las donaciones de 577

semillas, todas procedentes de la UMA “Proyecto Digitostigma” del Biól. Manuel Nevárez de los Reyes ubicada en Escobedo, Nuevo León.

Siembra in vitro

La siembra *in vitro* se realizó desinfectando un lote de 50 semillas de *D. caput-medusae* por inmersión en solución jabonosa más dos gotas de Tween 80 por 15 min; luego se sumergieron en etanol 70% (v/v) por 1 min y después hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) 30% (v/v) por 30 min, en agitación constante. Enseguida, bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión y 121° C, durante 20 minutos. Grupos de cinco semillas se colocaron en frascos Gerber® con medio de cultivo MS al 50% (conteniendo 1g/l de carbón activado, 30 g/l de sacarosa, 3.5 g/l de Gelrite® y pH 5.7). Estas plántulas fueron fotografiadas cada semana para registrar los eventos más importantes en el desarrollo de la especie y se describieron los mismos, para comparar con los resultados obtenidos por el proceso de injerto.

Lote de tratamientos hormonales 1 (LTH1)

Una vez que las plántulas tuvieron al menos 3 cm de altura (más de 84 días desde la germinación) se procedió a realizar la primera fase de inducción con reguladores de crecimiento vegetal. Para la inducción se disectó cada plántula en dos partes: el ápice y zona superior del hipocótilo por un lado y por otro el resto de la región basal del hipocótilo y zona radicular, ambas regiones de las plántulas fueron colocadas en frascos independientes con medio MS adicionado con 6 distintos tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L de BA por 0.1 y 0.5 mg/L de ANA), con el propósito de que dichas secciones continuaran su crecimiento y desarrollo hasta lograr la formación de brotes (Cuadro 7). Las condiciones de incubación bajo las cuales se mantuvieron los medios con las semillas, plántulas y secciones de éstas, fueron de 25 ± 2°C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de obscuridad y 50 µMol/m²/s de intensidad luminosa. El periodo de inducción fue de dos meses. Por ausencia de material suficiente, se

omitieron los controles y sólo fueron dos repeticiones por tratamiento.

Cuadro 7. Concentraciones de RCV en mg/L para el lote de tratamientos hormonales 1 (LTH1). Aplicado a 12 plántulas de 13 a 15 semanas de edad de la especie *D. caput-medusae*.

Concentraciones de RCV (BA/ANA)	0.5 mg/L BA	1.0 mg/L BA	2.0 mg/L BA
0.1 mg/L ANA	T1 =0.5 mg/L BA/0.1 mg/L ANA	T3 =1.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA	T5 =2.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA
0.5 mg/L ANA	T2 =0.5 mg/L BA/0.5 mg/L ANA	T4 =1.0 mg/L BA/0.5 mg/L ANA	T6 =2.0 mg/L BA/0.5 mg/L ANA

Lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2)

Un segundo lote de tratamientos hormonales (LTH2) fue puesto en marcha con los explantes tratados en primera instancia y con otras plántulas en desarrollo, esto se realizó después de 3 meses de cultivo y tres subcultivos en medio MS 50% (conteniendo 1g/l de carbón activado, 30 g/l de sacarosa, 3.5 g/l de Gelrite® y pH 5.7). Esta vez se realizaron cortes longitudinales en el hipocótilo de las plántulas de 20 semanas de edad para exponer el parénquima al efecto directo de los RCV. Se trabajó con el juego de concentraciones: BA 0, 1.0 y 2.0 mg/L en combinación con ANA 0 y 0.1 mg/L por un tiempo de inducción de 2 meses (Cuadro 8). Las condiciones de incubación fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de obscuridad y $50 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de intensidad luminosa. Se tuvieron 3 repeticiones de callos y dos réplicas de plántulas de *Digitostigma caput-medusae* por cada tratamiento.

Cuadro 8. Concentraciones de RCV en mg/L para el lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2). Aplicado a 12 plántulas de 20 semanas de edad y 18 réplicas de callos de la especie *D. caput-medusae*.

Concentraciones de RCV (BA/ANA)	0.0 mg/L BA	1.0 mg/L BA	2.0 mg/L BA
0.0 mg/L ANA	T1 =0.0 mg/L BA/0.0 mg/L ANA	T3 =1.0 mg/L BA/0.0 mg/L ANA	T5 =2.0 mg/L BA/0.0 mg/L ANA
0.1 mg/L ANA	T2 =0.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA	T4 =1.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA	T6 =2.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA

Propagación por injerto

El siguiente procedimiento de propagación se adaptó en instalaciones del vivero PIMVS “El Secreto de la Montaña” con Número de control MX-PIMVS-VIV-CO-312-MOR/12, ubicado en Cuernavaca, Morelos:

Germinación: En septiembre de 2012, 150 semillas de *D. caput-medusae* con una edad de 3 meses desde su colecta (producidas con plantas del mismo vivero) y sin desinfectar se colocaron en una charola de germinación blanco lechoso de unicel, llena con sustrato para germinar (80% tepojal con tamaño de grano menor a 5 mm de diámetro-20% composta). Se les aplicó una solución de fungicida Captan® de Bayer con una concentración de 1 g/100ml hasta saturación del sustrato. Se dejó la charola cerrada por los siguientes 30 días.

Injerto: A los 8 meses de edad, las plántulas de *D. caput-medusae* fueron injertadas sobre plantas jóvenes de *Ferocactus cylindraceus* (15 cm alto y 3 años de edad) siguiendo el procedimiento siguiente: 1) los portainjertos bien hidratados y sin sustrato fueron cortados con un corte transversal en la región superior, 3-4 cm por debajo del ápice y se cortaron los bordes del tallo a manera de “biselado” para evitar que con la deshidratación de los tejidos se promoviera el rechazo del injerto. 2) Se cortó la base del brote a injertar y se colocó corte sobre corte con suavidad y deslizando de lado a lado para retirar el aire que pudiera afectar la fusión de los tejidos. 3) Ya con las dos plantas colocadas, se procedió a inmovilizar el injerto con cinta plástica tipo playo o *egapack*® para evitar la deshidratación excesiva y fijar hasta que la fusión de tejidos estuviera terminada. Los injertos se guardaron en cualquier lugar fresco dentro de un invernadero. Cinco días después de haber realizado el injerto, se cortó el plástico que mantenía unidas a las dos plantas injertadas y se trasplantaron a macetas con el mismo tipo de sustrato que se usó para germinar las semillas. Después de cinco días más, se inició el proceso de riego de las macetas donde fueron trasplantados los injertos con agua corriente.

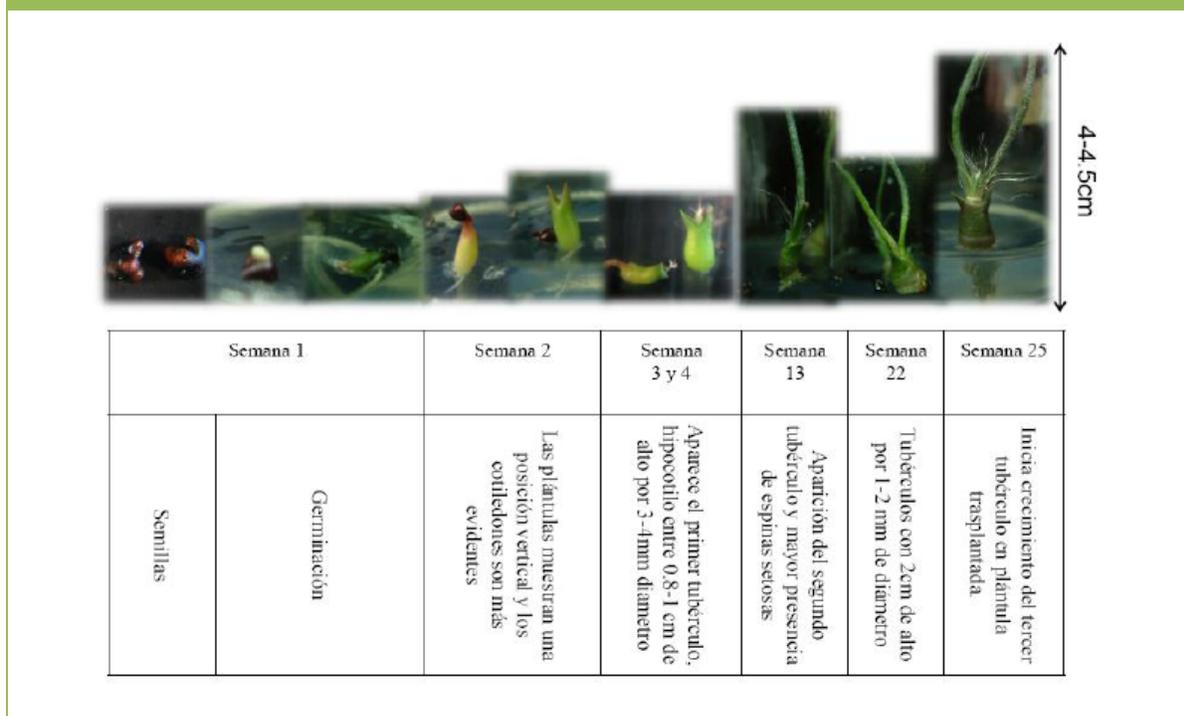
Para registrar el desarrollo de las plántulas injertadas se tomaron en cuenta los siguientes eventos: 1) pérdida de tubérculos pre-injerto, 2) aparición de tubérculos o brotación post-injerto y 3) número de tubérculos o brotes formados y 4) aparición de la primera floración. Se llevó el registro desde que germinaron las semillas y hasta que las

plantas tuvieron su primer evento reproductivo.

Resultados y discusión

La secuencia de desarrollo de las plántulas de *D. caput-medusae* obtenidas por siembra *in vitro* fue registrada cada semana con fotografías de los ejemplares y se anotaron las descripciones de los eventos más importantes y los tiempos observados, como se muestra en la Fig. 11.

Fig. 11. Desarrollo de plántulas de *D. caput-medusae* en cultivo *in vitro*. Utilizando medio MS 50% (conteniendo 1g/l de carbón activado, 30 g/l de sacarosa, 3.5 g/l de Gelrite® y pH 5.7). Las condiciones de incubación fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y $50 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de intensidad luminosa. Las fotografías muestran los principales eventos que distinguen el desarrollo de las plántulas mientras que estos eventos se mencionan en la información del cuadro que se encuentra debajo de las imágenes.



El rompimiento de la testa y surgimiento de la radícula de las primeras semillas ocurrió entre los días 2 y 5 después de la siembra y fue hasta el día 84 que se dejó de registrar. La radícula emergió primero en todos los casos. Desde el inicio, el hipocótilo

mostró una forma cilíndrica de entre 0.5 a 1cm de alto por 3-4 mm de diámetro. El primer tubérculo abundantemente cubierto de estigmas de color blanquecino con epidermis color verde oscuro, apareció entre la semana 3 y 4 y el segundo tubérculos apareció hasta los 80-84 días (12 semanas). Se tuvo un 43% de germinación total. El porcentaje de contaminación fue 0%.

Se observó la aparición de espinas setosas en el ápice de la plántula visibles después de la semana 22 y en algunos casos la radícula de las plántulas no se desarrollo más allá de 2 a 4 mm de largo en el interior del medio, mientras que en otros casos la radícula se elongó hasta alcanzar 1-1.5 cm de largo.

Respuestas morfogénéticas de tratamientos hormonales (LTH1)

Para los seis tratamientos del LTH1 (Cuadro 7) se utilizaron 12 plántulas de *D. caput-medusae* con una edad de 13 a 15 semanas (2 repeticiones por tratamiento). En todas esas plántulas se vieron daños por hiperhidratación al aparecer un callo cristalino y poco consolidado sobre los bordes y al interior de los explantes, cerca de la mitad de los explantes mostraron oxidación y necrosis en regiones cercanas al medio y esto se pudo deber quizá al efecto del alto contenido de agua y azúcares del medio de cultivo de inducción, de forma similar se reportó la hiperhidratación en explantes de *Mammillaria coahuilensis*, *M. san-angelensis*, *M. sanchez-mejoradae* y *Aztekium hintonii* (Calderón-Gil, 2007; Flores Rentería, 2008). Por la presencia de las zonas muertas por oxidación, los explantes de los seis tratamientos fueron bañados una sola vez con una solución esterilizada por filtración de 1 g/L de ácido ascórbico/1 g/L ácido cítrico. Un mes después de los baños antes mencionados, se detuvo la oxidación en los explantes y los callos lucían verdes y sin daños, después fueron colocados en medios MS 50% con 0.5 g l-1 de carbón activado y 1 g l-1 de manitol para evitar la hiperhidratación pero como esto impedía ver el efecto del barrido hormonal, se decidió a transferir los cultivos a medio MS 50% sin hormonas y libre de agentes osmóticos.

Los seis tratamientos del LTH1 presentaron una gran cantidad de respuestas morfogénéticas durante la fase de inducción que duró dos meses (marzo-mayo) y esas respuestas fueron la formación de callo hiperhidratado, raíces adventicias a partir de callo y

brotos laterales por organogénesis directa a partir de la región superior del hipocótilo. Las respuestas presentes en los seis tratamientos fueron el callo friable fotosintético más o menos consolidado y el callo fotosintético friable hiperhidratado. En el Cuadro 7 y en la Fig. 12 se ilustran las respuestas morfogénicas obtenidas para cada tratamiento hormonal en las concentraciones: 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L de BA por 0.1 y 0.5 mg/l de ANA.

Cuadro 9. Descripción de las diferentes respuestas morfogénicas para los 6 tratamientos hormonales del LTH1. Empleando 12 plántulas de 12 a 15 semanas de edad de la especie *D. caput-medusae*.

BA/ANA mg/l	Abundancia de callo	Color de callo	Número de brotes	No. de Raíces	Oxidación	Hiperhidratación
0.5/0.1	Abundante	Amarillo, café, verde	1	3	++	Abundante
0.5/0.5	Muy abundante	Amarillo, café, verde	0	4	++	Abundante
1.0/0.1	Muy abundante	Amarillo, café, verde	0	3	+	Muy abundante
1.0/0.5	Muy abundante	Amarillo, café, verde, rojizo	2	2	++	Muy abundante
2.0/0.1	Poco abundante	Amarillo, café, verde	0	0	++	Muy abundante
2.0/0.5	Abundante	Amarillo, café, verde, rojizo	0	1	++	Muy abundante

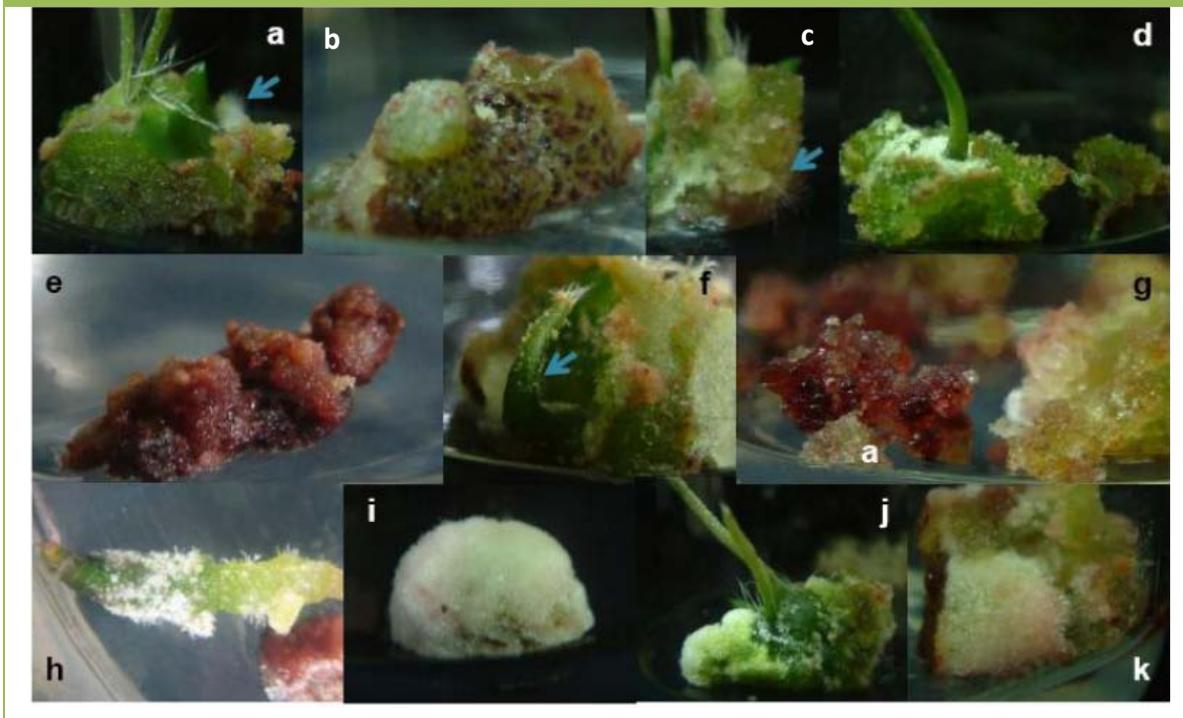
+++ 90% de oxidación, ++ 50% de oxidación, + 10% de oxidación

Para regenerar brotes por organogénesis directa es muy importante romper la dominancia apical y de ahí que se lleguen a utilizar altas concentraciones de citocininas en los rangos de 1.0, 3.0 y 5.0 mg/L de BA o KIN y bajas o nulas concentraciones de auxinas (Hubstenberger *et al.*, 1992; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007).

Para especies del género *Astrophytum*, *Ariocarpus*, *Leuchtenbergia* y *Mammillaria* es común encontrar respuestas morfogénicas como la formación de brotes por organogénesis directa y producción de callo usando concentraciones de 0.5, 1.0 y hasta 3.0 mg/L de BA y KIN (Starling, 1985; Stuppy y Nagl, 1992; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1998; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 2004; Lizalde-Viramontes *et al.*, 2004; Mendoza Madrigal, 2007; Flores-

Rentería, 2008; Garza-Padrón *et al.*, 2010). Estos resultados coinciden con los mostrados en este trabajo.

Fig. 12. Respuestas morfológicas de los explantes a partir de plántulas de *D. caput-medusae* para las seis concentraciones del LTH1. a, b, f y j) callo compacto verde fotosintético; b) callo suberizado; d, f, g, h, i y k) callos hiperhidratados blanquecinos; c) raíces [flecha]; f) brote de tubérculo [flecha]; e y g) oxidación extrema.



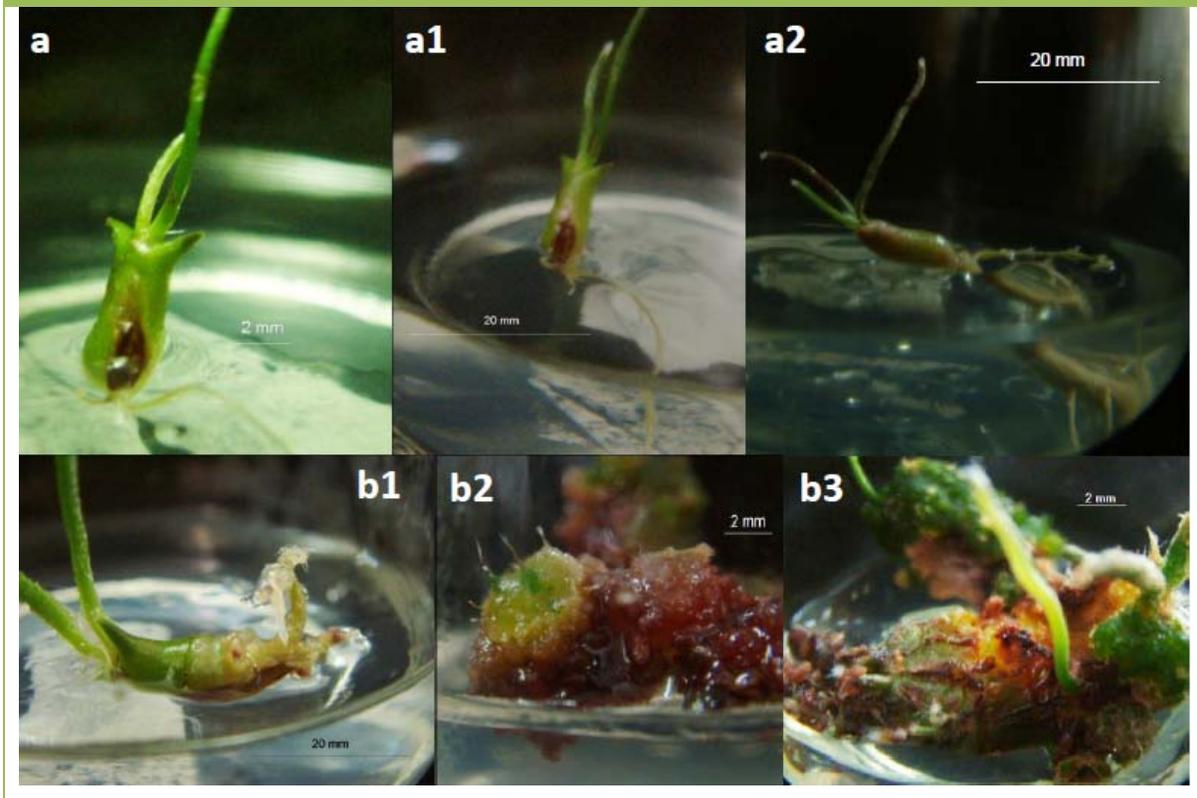
Dos meses y dos subcultivos después, en septiembre de 2010, los cultivos sufrieron una agresiva y rápida oxidación que no se pudo detener, aún con la aplicación de baños con solución antioxidante. Como resultado, 40% de ellos murieron antes de iniciar el segundo lote de inducción (LTH2).

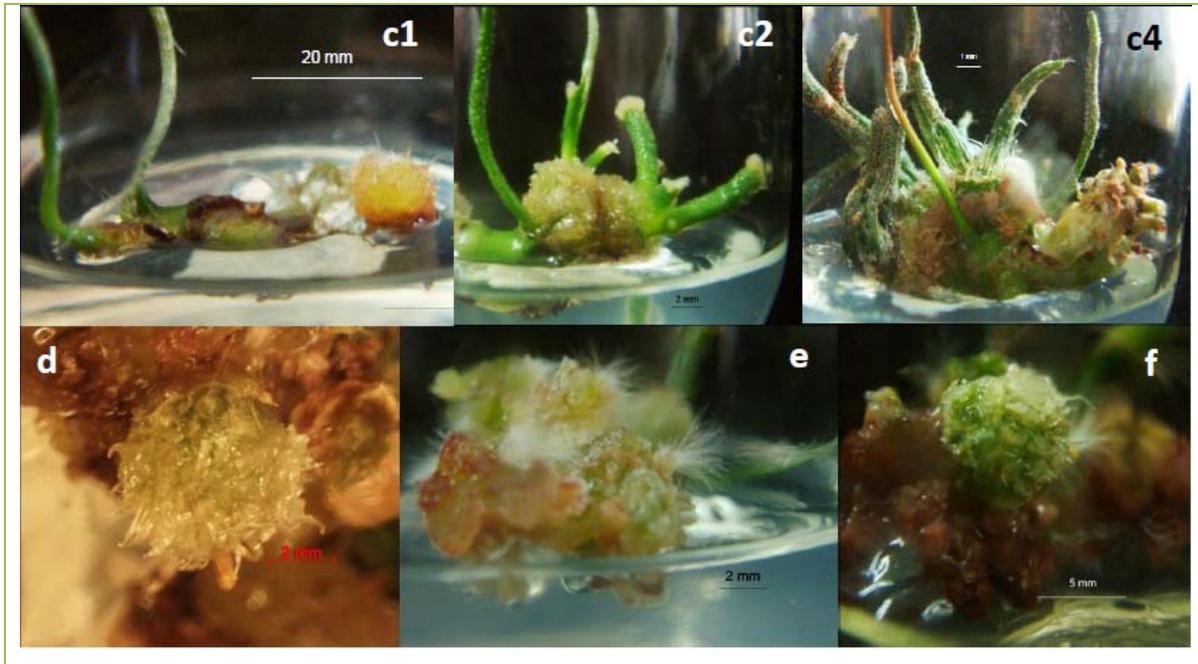
Lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2)

La regeneración *in vitro* por organogénesis directa a partir la zona apical se obtuvo en la concentración de 1.0 mg/L de BA en ausencia de auxinas (Tratamiento 3), mientras que en las concentraciones de 0.0 mg/L (BA)-0.1 mg/L (ANA), 1.0 mg/L (BA)-0.1 mg/L (ANA), 2.0 mg/L (BA)-0.0 mg/L (ANA) y 2.0 mg/L (BA)-0.1 mg/L (ANA) se produjo abundante

callo verde y friable (sin consolidar y propenso a oxidación severa). También se presentó organogénesis indirecta de raíces en el caso de la concentración 2.0 mg/L (BA)-0.1 mg/L (ANA). No se observó ningún tipo de respuesta morfogénica en el tratamiento control en completa ausencia de hormonas (Fig. 13a).

Fig. 13. Secuencias morfogénicas obtenidas de los explantes de plántulas de *D. caput-medusae* en el lote de tratamientos hormonales 2 (LTH2). **a**, Control (0.0 mg/L BA /0.0 mg/L ANA). **b**, Tratamiento 3 (1.0 mg/L BA/0.0 mg/L ANA). **c**, Tratamiento 3 (1.0 mg/L BA/0.0 mg/L ANA). **d**, estructura hialina diferenciada derivada de meristemos que dio origen a brotes. **e**, Tratamiento 4 (1.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA). **f**, Tratamiento 6 (2.0 mg/L BA/0.1 mg/L ANA). Todo en concentraciones de mg/L en medio de cultivo MS 50%. El tiempo de tratamiento está dado por los números: sin número (4 días, en medio de inducción con RCV); 1 (15 días, en medio de inducción con RCV); 2 (16 días sin RCV, a 3 meses y medio del inicio de la inducción); 3 (2.5 meses sin RCV, a 6 meses del inicio de la inducción); 4 (más de 3 meses sin RCV, a más de 6 meses del inicio de la inducción). Las barras de escala





Las regiones apicales regenerantes sufrieron una proliferación muy acelerada y produjeron una gran cantidad de callo durante la fase de inducción. Al liberarse a los explantes de la influencia de los RCV después de 3 meses de inducción, se registró la diferenciación de algunas estructuras hialinas organizadas (Fig. 13d) a partir de las cuales se formaron los tubérculos y regiones apicales mostradas en las fotografías b2 y c2 de la Fig. 13.

Los tratamientos 2, 4 y 5 (0.0 mg/L BA-0.1 mg/L ANA, 1.0 mg/L BA-0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BA-0.0 mg/L ANA, respectivamente) siguieron formando callo fiable y verde durante la inducción y aún después del trasplante a medio sin RCV. Sólo el tratamiento 5 con 2.0 mg/L de (BA)-0.0 mg/L de (ANA) formó raíces directamente del callo, pero las raíces no proliferaron y se quedaron estacionadas en el tamaño que muestran las fotografías e y f de la Fig. 13.

Siete meses después de la inducción, los brotes regenerados se encontraban creciendo y la oxidación general de todos los tratamientos se pudo detener con la aplicación de 1g/l de PVP al medio MS 50%, sustituyendo así, los baños con antioxidantes.

Los brotes regenerados a partir de los pasados tratamientos hormonales presentaron una hipertrofia considerable, lo que provocó que no soportaran la deshidratación durante el proceso de aclimatación y murieran a las pocas horas de ser puestos en condiciones *ex*

in vitro. Otros trabajos han reportado problemas de baja regulación del contenido de agua incluso en plantas producidas por cultivo *in vitro* (Malda *et al.*, 1999; García-Rubio y Malda-Barrera, 2010). Una solución viable podría ser la utilización de injertos para aclimatizar callos y brotes, pero la consistencia de los callos y brotes obtenidos en ambos tratamientos con RCV no fue la adecuada, es decir, no estaban bien consolidados y estaban hiperhidratados.

Propagación por injerto

Se obtuvo un 80% de germinación de las 150 semillas, lo que significó un total de 120 plántulas. Iniciando la germinación en el quinto día y terminando a los 19 días después de la siembra. Luego de 8 meses de crecimiento vigoroso con la charola de germinación cerrada en condiciones de invernadero (que en ocasiones pudo haber alcanzado una temperatura de 38°C), se tuvieron plántulas de 12 a 15 cm de alto (desde la punta de la raíz hasta la punta del tubérculo más largo), como se puede ver en la Fig. 14.

Esta técnica de propagación tradicional, mostró una supervivencia del 100% en los 30 injertos que se realizaron. La pérdida de tubérculos pre-injerto se presentó de una semana a semana y media después de que se rompieron las cintas plásticas que sujetaban el injerto. La aparición de los nuevos tubérculos post-injerto se mostró entre 6 y 8 semanas después, sobre todo en la región de la base del hipocótilo (Fig. 14 C y C.1). El número de tubérculos o brotes formados fue de 3 a 6 el segundo mes y con uno o dos brotes basales por plántula (en promedio 1.5 brotes por plántula). La aparición de la primera floración ocurrió entre los 11 meses posteriores a la germinación y tres meses después de ser injertadas y estuvo antecedida por el surgimiento de los primeros tubérculos maduros con areolas dimórficas. En promedio, los tubérculos de las plantas injertadas midieron 4.5 mm de diámetro por 7.8 cm de largo.

El resto de las plántulas que se germinaron funcionaron como los testigos del experimento (90 en total) y éstas no alcanzaron la madurez luego de 11 meses de crecimiento, tampoco mostraron tubérculos maduros (con areola florífera), ni produjeron brotación alguna; el tamaño final de esas plántulas fue de 14.7 cm de alto (desde la punta de la raíz hasta la punta del tubérculo más largo) en promedio y a la fecha continúan su

desarrollo.

Fig. 14. Propagación por injerto de *Digitostigma caput-medusae* sobre *Ferocactus cylindraceus*. Las imágenes describen el desarrollo de las plántulas de *Digitostigma caput-medusae* desde los 8 meses de edad de antes del injerto (A). Plántula de 8 meses más un mes en injerto (B). Plántula de 8 meses más dos meses en injerto con presencia de brotes laterales surgiendo de la base del hipocótilo (C). Ampliación de esos brotes del hipocótilo (C.1.)^b Planta de 8 meses más 3 meses en injerto, en inicio de la madurez sexual (primero evento reproductivo) y con brote lateral (D). Finalmente, la foto D.1. muestra la presencia de los botones florales sobre los tubérculos maduros, indicando que la planta alcanza la madurez reproductiva aproximadamente al año de su germinación convencional.



Flores Pérez (2009), encuentra que la técnica de injerto acelera el desarrollo en diámetro, tamaño, número de brotes y número de flores de las especies injertadas y mejora la capacidad de producción de forma comercial. También reporta que la técnica favorece el crecimiento de brotes laterales en *Copiapoa tenuissima*, *Notocactus leninghausii* y *Rebutia muscula*, dependiendo de los fertilizantes utilizados y de la especie de portainjerto utilizada. Es en el sentido de la producción acelerada que se sugiere la utilización de esta técnica, pues las especies más amenazadas tienen bajas tasas de toma de nutrientes en sus raíces,

ciclos de vida largos y baja capacidad de producción de semillas (Flores Pérez, 2009; Puente Alarcón, 2009).

Normalmente y en sus propias raíces, la especie *D. caput-medusae* requiere más de 3 años para madurar. Esto se sabe porque algunas de las plántulas germinadas *in vitro* han sido monitoreadas hasta la fecha (3 años después) sin que se presente la aparición del primero evento reproductivo (Antonio Díaz y Manuel Nevárez de los Reyes, comunicación personal). Aquí cabe apuntar que el cultivo *in vitro* aceleró el crecimiento de las plántulas en un principio, pues en condiciones *ex vitro* la aparición del segundo tubérculo no ocurre hasta después de los seis meses de edad, mientras que en condiciones *in vitro* la aparición del segundo tubérculo ocurre a las 13 semanas. Sólo que cuando las plantas germinadas *in vitro* son pasadas a condiciones *ex vitro*, su crecimiento se detiene considerablemente, posiblemente porque la especie tiende a poner mayor esfuerzo en el desarrollo de la raíz fasciculada de reserva. Esto último no ocurre en condiciones de injerto, pues la plántula de *D. caput-medusae* no desarrolla la raíz.

El cultivo *in vitro* puede regenerar brotes con tratamientos hormonales altos en cinetinas (Santos Díaz *et al.*, 2001; Singh Bhau, 1999; Ramírez-Malagon *et al.*, 2007), lo puede hacer directamente a partir de la zona apical del tallo, como resultó en este trabajo (en la concentración de 1mg/L de BA en ausencia de auxinas), pero esto sucede en bajos porcentajes y los brotes carecen de la región del hipocótilo y raíces. También se pueden presentar otras respuestas como la organogénesis indirecta de raíces en el caso de la concentración 2.0 mg/L BA-0.1 mg/L ANA del LTH2. Ambos resultados coinciden con lo encontrado por García-Rubio y Malda-Barrera (2010) en el caso de *Mammillaria mathildae*.

Con este trabajo se corroboró que con la ayuda de sustancias como el D-manitol o el carbón activado, se puede evitar el daño al explante a través de la hiperhidratación y la oxidación, igual que lo reportado por Santos Díaz y colaboradores (2001) con cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma*. Otros trabajos también reportan el impacto negativo de la oxidación e hiperhidratación sobre los cultivos *in vitro* (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007).

Conclusión

La exploración del potencial regenerativo *in vitro* de las distintas estructuras corporales de *D. caput-medusae* obtenidos a partir de semilla, tales como regiones apicales y secciones transversales de tallo mostró que la especie tiene una restricción leve para responder a los tratamientos hormonales, pudiendo producir respuestas como el callo fotosintético friable y generación de raíces y brotes con tubérculos. También se reporta organogénesis directa a partir de la zona apical de las plántulas en un tratamiento alto en cinetinas (Tratamiento 3 del LTH2 (1.0 mg/L BA-0.0 MG/L ANA) en la Fig. 13. Corroborando que en cactáceas la presencia de las cinetinas es esencial para producir brotación, no así con las auxinas. Se pudo observar que el efecto de ambas técnicas tiene ventajas tanto para la integridad de los tejidos como para la supervivencia y reproducción de la especie.

Se concluye que la mejor estrategia debe tener una combinación de lo mejor de ambas técnicas, es decir, la propagación *in vitro* proporciona rapidez en la germinación y crecimiento de las plántulas, respuestas morfogénicas varias, abundante material vegetativo y cultivos libres de patógenos. Mientras que la técnica convencional de injerto proporciona rapidez en la maduración de las plantas, mayores porcentajes de supervivencia y mayor productividad reproductiva, reflejada en más flores, frutos y semillas.

Es necesario complementar los resultados obtenidos en este estudio con nuevos experimentos para lograr el establecimiento de las plántulas obtenidas por organogénesis directa e indirecta y para esto, será necesario realizar estudios para mantener y producir callos bien consolidados y compactos que permitan incluso su injerto en condiciones *ex vitro*.

Estudio comparativo de la morfología, crecimiento y secuencia ontogenética de los meristemos apicales del tallo en plántulas de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma* (Cactaceae)

Resumen

Se describieron la morfología y crecimiento de plántulas de 4 especies del género *Astrophytum* y *Digitostigma caput-medusae* y por otro lado, se compararon las secuencias ontogenéticas del meristemo apical del tallo (MAT) de las mismas especies. Se utilizaron plántulas de 5, 15, 30, 60, 90 y 365 días para describir su morfología, crecimiento y para caracterizar el MAT por cortes histológicos por inclusión en resina sintética. Las plántulas de *D. caput-medusae* con sus grandes cotiledones e hipocótilo delgado y cilíndrico, fueron más afines a las plántulas de taxones de las subfamilias Pereskioideae y Opuntioideae. Por otro lado, los cotiledones reducidos de las plántulas del género *Astrophytum* fueron un carácter derivado comparado con los cotiledones de plántulas de las subfamilias antes mencionadas. Las plántulas más pequeñas de ambos géneros fueron las de *A. asterias*, seguidas de *D. caput-medusae*, *A. capricorne*, *A. myriostigma* y finalmente la más grande correspondió a la especie *A. ornatum*. Sin embargo, en cuanto a diámetro de MAT se refiere, *D. caput-medusae* tuvo los valores más bajos, seguida de *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. ornatum* y los valores más altos los mostró *A. myriostigma*. Todas las especies del género *Astrophytum* y *D. caput-medusae* presentaron un MAT con una sola capa de células de la túnica, un corpus bien estructurado y no se observó la presencia de células madre.

Introducción

Desde que germinan hasta que mueren, las plantas vasculares producen nuevas células y desarrollan nuevos órganos en zonas especializadas llamadas meristemos. Los meristemos se clasifican por la posición que ocupan en el cuerpo de la planta y se les llama meristemos apicales (del tallo y raíz), meristemos laterales y meristemos intercalares. El meristemo apical del tallo (MAT) está localizado en los ápices de tallos principales o laterales, mientras que el meristemo apical de la raíz se encuentra en el polo opuesto de la planta, es decir, en la región terminal de la raíz (Evert, 2006).

Las células que permanecen y mantienen a los meristemos apicales son llamadas *células iniciales* o simplemente *iniciales*. A su vez, esas células iniciales pueden dar origen a células del cuerpo de la planta y a otras células *iniciales* (Evert, 2006). Cuando se habla de la diferenciación de células, las células iniciales y sus derivados más recientes son llamados promeristemos o protomeristemos para ser distinguidos de los tejidos meristemáticos subyacentes y parcialmente diferenciados. El *protoderma* es el tejido que generará la epidermis, el *procambium* va a generar a los tejidos vasculares primarios y el

meristemo fundamental será el precursor del tejido fundamental. Estos tres conforman en meristemo primario (Evert, 2006). Los tejidos meristemáticos presentan un arreglo de células variable que resulta de los diferentes patrones de división celular y alargamiento. En plantas con semilla los patrones de división son determinados con frecuencia por la distribución interna del crecimiento y por la forma externa del ápice (Evert, 2006).

El MAT tiene como funciones la formación de los ejes del tallo y la iniciación de órganos laterales, tales como las hojas y ramas (Kwiatkowska, 2004). El MAT también cumple la función de autoperpetuarse y tanto la forma como el tamaño del mismo deben permanecer casi constantes o con ligeros cambios a lo largo del tiempo y del desarrollo de las plantas (Kwiatkowska, 2004). De hecho esos cambios pueden incluir el incremento del volumen, composición y aparición de nuevas zonas (Niklas y Mauseth, 1981; Evert, 2006).

La estructura del MAT en angiospermas está dividida en varias zonas conocidas como túnica (T), células madre centrales (CMC), la zona periférica (ZP) y el meristemo de la médula o pith-rib meristem o meristemo fundamental (MF) (Mauseth, 1978). Mauseth (1978), reconoce tres tipos de organización en el MAT embrionario en 28 miembros de la familia Cactaceae al momento de la germinación: 1) túnica/corpus; 2) túnica/células madre centrales/corpus; 3) túnica/células madre centrales/zona periférica/meristemo de la médula. De las tres variantes anteriores, el tercer tipo presenta una zonación completa y sufre pocos o ningún cambio en su estructura a lo largo del desarrollo de las plantas, mientras que las otras dos versiones de meristemos aún deben completar su regionalización con el paso del tiempo (Mauseth, 1978). Según Mauseth (2004), en cactáceas, la túnica puede ser uniestratificada y el corpus puede estar compuesto de tres zonas: la central (CZ), la periférica (PZ) y la zona de las bandas o nervaduras (RZ). La estructura de los meristemos apicales del tallo dependerá del tamaño y diámetro del tallo en la planta adulta, del grupo de plantas y en última instancia, de su historia evolutiva (Mauseth, 2004; Mauseth, 2006). Dichos cambios en estructura del MAT pueden ser analizados mediante las secuencias ontogenéticas de las distintas especies, abarcando las etapas de embrión, plántula, juvenil y adulta.

Cada región del MAT puede dar origen a distintos tejidos y órganos bien localizados y diferenciados. La túnica dará origen a las hojas, epidermis y cortex. En tanto que el corpus originará al sistema vascular del tallo y al tejido de la médula. En cortes

histológicos, las células del MAT presentan citoplasmas densos y carecen de vacuolas, rasgo común de las células con alta actividad de proliferación. Por otro lado, debajo de estas células del meristemo con activa división celular, se encuentran células alargadas y vacuoladas (Cutler *et al.*, 2007). El surgimiento de las primeras hojas en su respectiva filotaxia también está acompañado del surgimiento de las bandas del procambium, y de este último tejido meristemático surgirán los primeros indicios del floema y xilema (Cutler *et al.*, 2007). Los primordios de hojas se formarán de manera lateral, conforme sean generados y en cortes longitudinales serán apreciados como abultamientos a ambos lados del domo que conforma al meristemo (Cutler *et al.*, 2007).

Además de Mauseth (1978), pocas son las investigaciones que tratan el tema de los meristemos apicales en especies de la familia Cactaceae (Niklas y Mauseth, 1981; Kwiatkowska, 2004; Mauseth, 2004; Mauseth, 2006).

Así mismo, el estudio anatómico y descriptivo de las secuencias ontogenéticas de las plántulas en cactáceas es escaso (Mauseth, 1978; Niklas y Mauseth, 1981; Loza-Cornejo *et al.*, 2003; Loza-Cornejo y Terrazas, 2003; Ayala-Cordero *et al.*, 2006). Este tipo de estudios han servido para entender el establecimiento y las estrategias adaptativas relacionadas con el metabolismo CAM (Ayala-Cordero *et al.*, 2006).

En el caso de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma*, el estudio de la secuencia ontogenética de las plántulas y la estructura del MAT podrían ayudar a explicar las diferencias morfológicas que existen entre los mismos géneros y entre sus especies. Por otro lado, podrían aportar información acerca de las distintas adaptaciones que presentan a sus condiciones ecológicas específicas.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Describir la morfología y desarrollo de las plántulas de las especies de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma*. 2) Describir la secuencia ontogenética de meristemos apicales del tallo dentro de las especies de los géneros *Astrophytum* y *Digitostigma*.

Materiales y Métodos

Como lo indica el Cuadro 8, se utilizaron 5 lotes de 50 semillas cada uno de las especies *A. asterias*, *A. capricorne* y *A. ornatum*, *A. myriostigma* y *D. caput-medusae* de distintas

edades y procedencias. Los lotes de las primeras tres especies fueron donados por el banco de semillas que mantiene la M. en C. Mariana Rojas Aréchiga (Técnico Académico del Lab. De Genética y Ecología del Inst. de Ecología, UNAM) y el Biól. Manuel Nevárez de los Reyes de la UMA “Proyecto *Digitostigma*” donó los lotes de las otras dos especies.

Cuadro 10. Semillas de las especies del género <i>Astrophytum</i> y de <i>Digitostigma caput-medusae</i> (edad y fecha de colecta).		
Especie	Edad de las semillas desde su cosecha	Fecha de colecta
<i>Astrophytum asterias</i>	2 meses	2008
<i>Astrophytum capricorne</i>	2 años	2008
<i>Astrophytum myriostigma</i>	1 mes	2010
<i>Astrophytum ornatum</i>	2 años	2008
<i>Digitostigma caput-medusae</i>	2 meses	2010

Germinación

Los lotes de 50 semillas de las especies mencionadas en el Cuadro 8 fueron sembrados dentro de cajas Petri con agar bacteriológico al 1%, se colocaron dentro de una bolsa de plástico transparente y colocados en una cámara de germinación (Lab-Line Instruments, Inc. modelo 844L, IL, ISA), se registró la germinación cada tercer día durante un período total de 30 días (Bautista-Alvarado, 2007; Rojas-Aréchiga, 2013). El criterio para registrar la germinación de una semilla fue que la radícula emergiera de la testa, no importando si la plántula sobrevivió o no posteriormente (Loza-Cornejo et al., 2003; Bautista-Alvarado, 2007). Cumplidos los 30 días del experimento de germinación, las plántulas se colocaron en nuevos frascos Gerber® con sustrato (1:1 de composta y tepojal fino) para evitar infecciones y pudrición de la raíz y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones dentro de la incubadora. Luego de otros 30 días, los lotes de plántulas fueron transferidos a macetas de plástico de 3” con la misma mezcla de sustrato usada con anterioridad y fueron mantenidas bajo cultivo en condiciones de invernadero con riego cada quince días.

Muestreos de plántulas y morfología

Iniciada la germinación en los cinco lotes de semillas, se tomaron 4 plántulas de cada

especie en los intervalos de 5, 15, 30, 60 y 90 días y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 5% disuelta en un buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0-7.2 (Loza-Cornejo *et al.*, 2003; Ayala-Cordero *et al.*, 2006). Cada muestra fue colocada en tubos Eppendorf de 15 ml y almacenados a temperatura ambiente forrados con papel aluminio. A cada plántula le fue realizado un corte pequeño en el hipocotilo para que el fijador penetrara la epidermis y llegara al resto de los tejidos. Los tubos fueron etiquetados indicando la edad de las plántulas y la especie (Ej. fecha+especie, ejem. 5Dcm). Se midieron la longitud y diámetro del hipocotilo y longitud de la raíz con el vernier digital Mitutoyo Digimatic SR44 (Loza-Cornejo *et al.*, 2003; Ayala-Cordero *et al.*, 2006).

Deshidratado y montaje de preparaciones y anatomía

Luego de la fijación en glutaraldehído 5%, las plántulas fueron lavadas con el mismo buffer de fosfatos y deshidratadas con las concentraciones de etanol de 50%, 70%, 96% y dos veces más con etanol 100% por un tiempo de 24 h por cada concentración, En seguida, las muestras fueron infiltradas con soluciones de metilmetacrilato-etanol absoluto en las concentraciones de 30%-70%, 50%-50%, 70%-30% y 100%, por 24 horas en cámara de vacío. Luego se colocaron las muestras para su inclusión final en una solución de metilmetacrilato adicionada con 16% del volumen del endurecedor. Las muestras endurecidas fueron montadas en cubos de madera y fijadas con pegamento sintético para después realizar los cortes de 6-8 μm con un micrótopo de deslizamiento. Los cortes se tiñeron con azul de toluidina con ácido bórico como mordiente.

Se describió la morfología y estructura de los meristemos según los trabajos de Mauseth (1978) y Kwiatkowska (2004) con un microscopio Zeiss. Además, se midieron el largo del domo del meristemo apical, la altura del domo desde la base de los tubérculos o costillas nacientes y la distancia entre cotiledones con ayuda del software Image Pro-Plus versión 6.1. Se realizaron regresiones exponenciales con el Software Excel 2007 entre el largo del domo y la edad de las plantas con la finalidad de identificar diferencias en las tasa de crecimiento entre especies.

Resultados y discusión

Morfología de plántulas

La germinación se presentó entre los 5 y 6 días, durante la cual, todas las especies rompieron la testa y emergieron por la zona del rafe o quilla, pues es cerca de esta zona que se encuentra el micrópilo; estos resultados coinciden con lo que menciona White Olascoaga (2006) para las especies *A. capricorne*, *A. myriostigma* y *A. ornatum* y corresponde con el comportamiento de especies fotoblásticas positivas de la Tribu Cacteae (Rojas-Aréchiga, 2013). También se reporta este fenómeno para *A. asterias* y *D. caput-medusae*. La estructura que primero emergió fue la radícula, con abundantes pelos radiculares y después emergió el hipocótilo, existiendo una clara constricción entre ambas zonas. Las plántulas presentaron una coloración rojiza durante un tiempo, señal de la síntesis de betalainas, como lo reportan para las plántulas de *Stenocereus beneckeii* y *S. queretaroensis* Ayala-Cordero *et al.* (2006) y Loza-Cornejo *et al.* (2003), respectivamente.

Los cotiledones en todas las especies del género *Astrophytum* y en *D. caput-medusae* fueron evidentes, opuestos y flanqueando la zona del MAT, sin embargo, en *A. asterias* los cotiledones fueron claramente más reducidos (< 1 mm) y más redondeados que en las otras especies (Fig. 15^a, plántula de 5 y 15 días de edad; Fig. 16). En este sentido, las especies *A. capricorne*, *A. myriostigma* y *A. ornatum* desarrollaron cotiledones cortos (ca. 1 mm), cónicos, puntiagudos y de forma ascendente (Fig. 15b, c, d, plántulas de 5 y 15 días de edad; Fig. 16). En el caso de *D. caput-medusae*, cotiledones (> 1 mm), cónicos, con la cara interior plana y ascendentes (Fig. 15e, plántulas de 5 a 90 días de edad; Fig. 16). Después de casi un año, las plántulas reducen, marchitan y pierden los cotiledones (Fig. 15) por un proceso que Ganong (1898) nombró “metamorfosis ontogenética”, aunque se ha visto que *D. caput-medusae* puede retener los cotiledones por más de un año (Manuel Nevárez de los Reyes, comunicación personal).

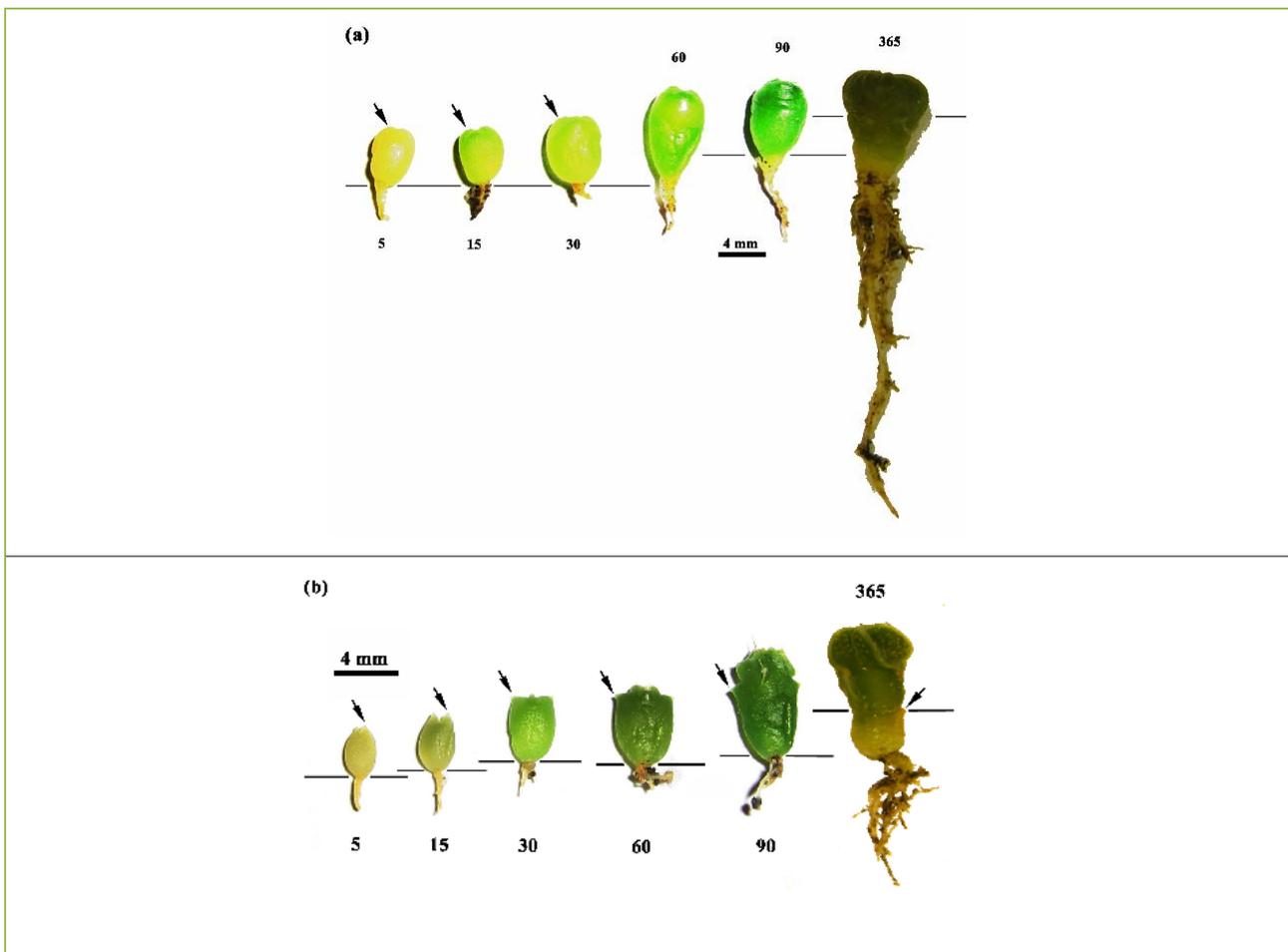
A. asterias tuvo la plántula más corta y redondeada (ca. 5 mm de alto y ancho); seguida de *A. capricorne* con una plántula corta y aplanada en sentido opuesto al eje de los cotiledones (Fig. 15). *Astrophytum myriostigma* y *A. ornatum* desarrollaron plántulas más cilíndricas, altas y ligeramente aplanadas en el mismo sentido que las plántulas de *A.*

capricorne, solo que *A. ornatum* tuvo la plántula más alta y grande de de ambos géneros (ca. 1 cm de alto) (Figs. 15, 16). Estos resultados coinciden con los tamaños de las plántulas de White Olascoaga (2006), pues se encontró que las más grandes son las de *A. ornatum*, seguidas de *A. myriostigma*, *A. capricorne* y *A. asterias*. Las plántulas de las especies de *Astrophytum* presentaron tallas pequeñas, hipocótilos reducidos y suculentos como estructuras de reserva de nutrientes y cotiledones extremadamente reducidos, que Mauseth (1978) considera como caracteres derivados con respecto a los que presentan taxones de las subfamilias Pereskioideae y Opuntioideae. Por otro lado, las plántulas de *D. caput-medusae* presentaron una forma corta cilíndrica y con los cotiledones extendidos hacia arriba (ca. 8 mm de altura total), siendo más semejantes a las plántulas de los taxones pertenecientes a las subfamilias arriba mencionadas que tienen hipocótilos largos, con pocas reservas y cotiledones bien desarrollados de más de 1.5 cm de largo (Figs. 15, 16) (Mauseth, 1978). Las plántulas de ambos géneros exhibieron un gran alargamiento de la raíz, resultando superior al alargamiento que mostró el hipocótilo, lo cual podría estar relacionado con la búsqueda de agua y nutrientes para el futuro establecimiento de las plántulas, como lo indican los estudios de Ayala-Cordero *et al.* (2006) y Loza-Cornejo *et al.* (2003) (Figs. 15, 16). En todas las especies del género *Astrophytum* el diámetro del hipocótilo no presentó grandes cambios (Fig. 16), excepto por el intervalo comprendido entre los 30 y 60 días, posiblemente relacionado con el cambio de condiciones de siembra, pues las plántulas salieron de la incubadora, dejaron de estar en un medio pobre (agar y agua corriente) e iniciaron su crecimiento en condiciones de invernadero con sustratos fértiles. Luego de los 60 días, el diámetro del hipocótilo en todas las especies del género *Astrophytum* se mantuvo igual hasta los 365 días en que terminaron los registros, esto posiblemente porque el desarrollo y crecimiento se concentró principalmente en la región del tallo y las raíces. Sólo en *A. asterias* se observa una ligera tendencia hacia el incremento de la longitud del hipocótilo, lo que se puede considerar como evidencia de que el “tallo subterráneo” es formado por el hipocótilo contráctil, al menos parcialmente. En *D. caput-medusae* tanto la longitud como el diámetro del hipocótilo tuvieron incrementos considerables (de casi el 50% desde el día 90 y hasta los 365 días), esto posiblemente porque el hipocótilo debe asumir gran parte de la producción de nutrientes para continuar generando los tubérculos de la plántula. Al igual que en *A. asterias* se puede proponer que

el hipocótilo y las raíces contráctiles sean las responsables de la formación del tallo subterráneo y engrosado que aparece en plántulas de más de un año de edad.

Otra especie que mostró este tipo de hipocótilo y raíces contráctiles fue *A. capricorne*, solo que en este último caso el tallo que se desarrolla es totalmente epigeo.

Resumiendo, todas las especies tuvieron un hipocótilo epigeo desde la germinación y hasta los 90 días de edad, para posteriormente separarse en plantas con tallos completa o parcialmente hipogeos (*A. asterias*, *A. capricorne* y *D. caput-medusae*) y plantas con tallos completamente epigeos (*A. myriostigma* y *A. ornatum*). En ambos casos la nueva ubicación del tallo e hipocótilos se desarrolló después de los 90 días y se hizo más evidente en plántulas de un año de edad (Figs. 15, 16)



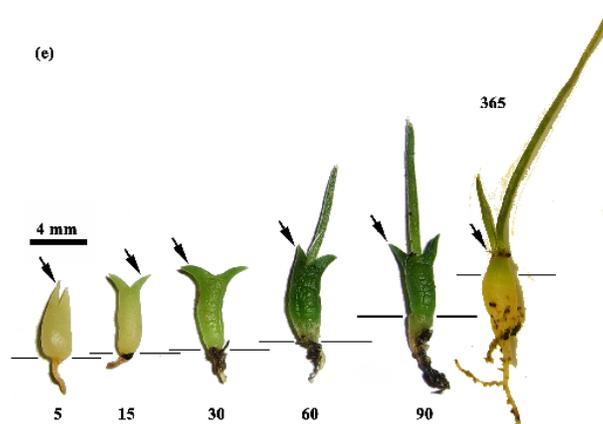
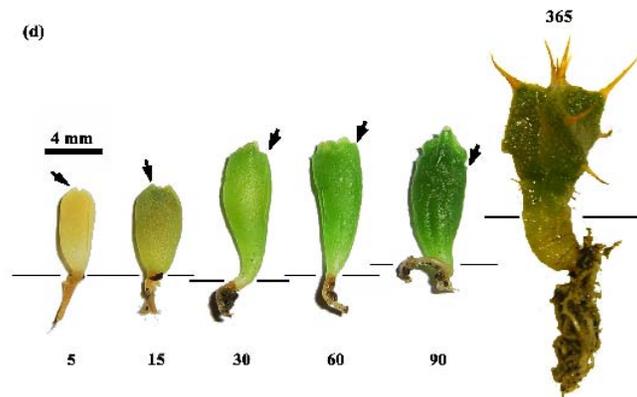
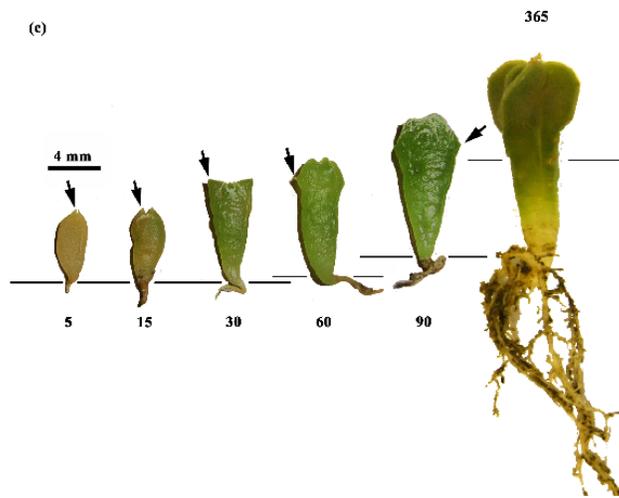


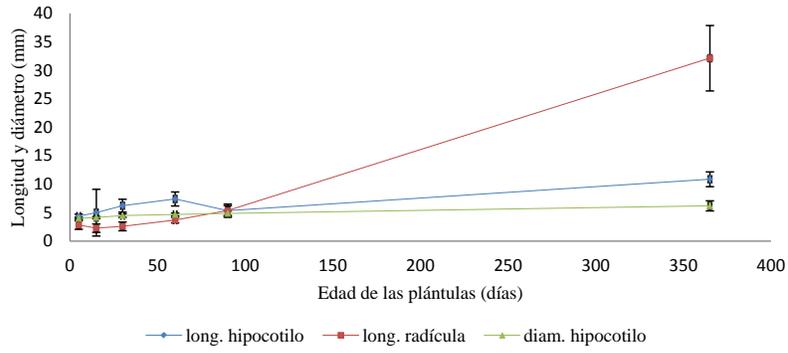
Fig. 15. Secuencia de crecimiento de las plántulas. Especies: *A. asterias* (a), *A. capricorne* (b), *A. myriostigma* (c), *A. ornatum* (d) y *D. caput-medusae* (e). La barra de escala tiene un valor de 4 mm. Las flechas marcan la presencia de los cotiledones. Las líneas

negras horizontales marcan el nivel del sustrato y la región del tallo o raíz que se encuentra enterrada. Los números debajo o arriba de cada plántula indican su edad en días.

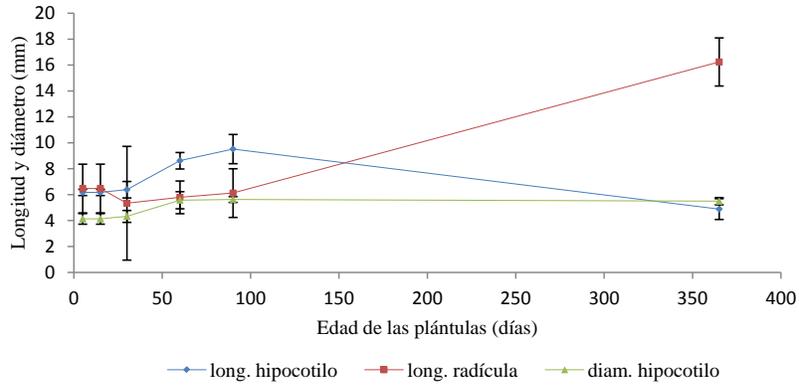
Cabe señalar que algunas poblaciones de *A. asterias* y la única conocida de *D. caput-medusae* se encuentran en zonas cuya vegetación característica es el matorral tamaulipeco o matorral bajo subinerme que se desarrolla en climas de tipo semiseco cálido con lluvias escasas en verano y que en esas condiciones la pérdida de humedad por efecto del viento y condiciones edáficas puede ser severa (González Rodríguez y Cantú Silva, 2001). En ese sentido, los tallos hipogeos pueden ayudar a contrarrestar los efectos climáticos y edáficos adversos sobre las plántulas, pero se requieren mayores investigaciones al respecto. Las otras tres especies del género *Astrophytum* habitan en matorrales con condiciones no tan severas (White Olascoaga, 2006; López-Flores y Golubov, 2010; Zepeda Martínez, 2010; Bravo Espinosa, 2011) y por eso es posible que su tallo globoso a columnar y epigeo les sea más favorable.

Desde los 15 días, en todas las especies del género *Astrophytum* y en *D. caput-medusae* se separaron los cotiledones y surgieron las primeras areolas, advirtiéndose en *A. capricorne* la presencia de espinas diminutas (Fig. 15). A partir del día 30 y en adelante, todas las plantas del género *Astrophytum* y *D. caput-medusae* mostraron el desarrollo paulatino de areolas, tubérculos y costillas. Conforme el tallo se fue desarrollando, las costillas fueron siendo más evidentes en las especies de *Astrophytum*, marcándose el patrón de tres a seis costillas en *A. myriostigma*, 7 a 9 costillas en *A. asterias* y 5 a 8 en *A. capricorne* y *A. ornatum* (Fig. 15). *D. caput-medusae* no mostró indicios de los tubérculos hasta un período comprendido entre los días 30 y 60, siendo el desarrollo de los mismos un proceso más lento que el desarrollo de costillas en las especies del género *Astrophytum* y a diferencia de este último, los tubérculos siguieron un patrón de filotaxia en espiral surgiendo de un tallo cortamente cilíndrico llamado *braquiblasto* (Fig. 15 y 16).

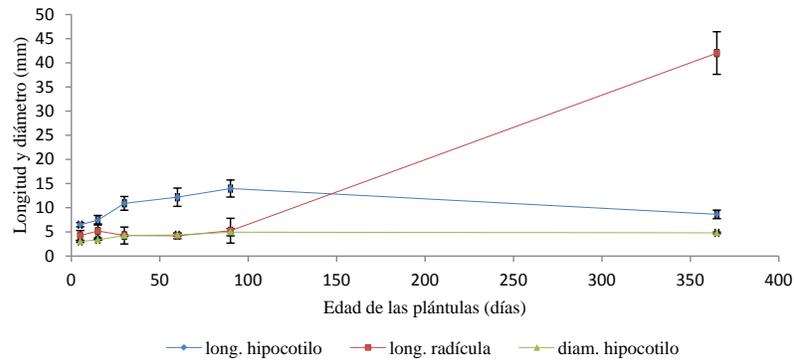
Astrophytum asterias

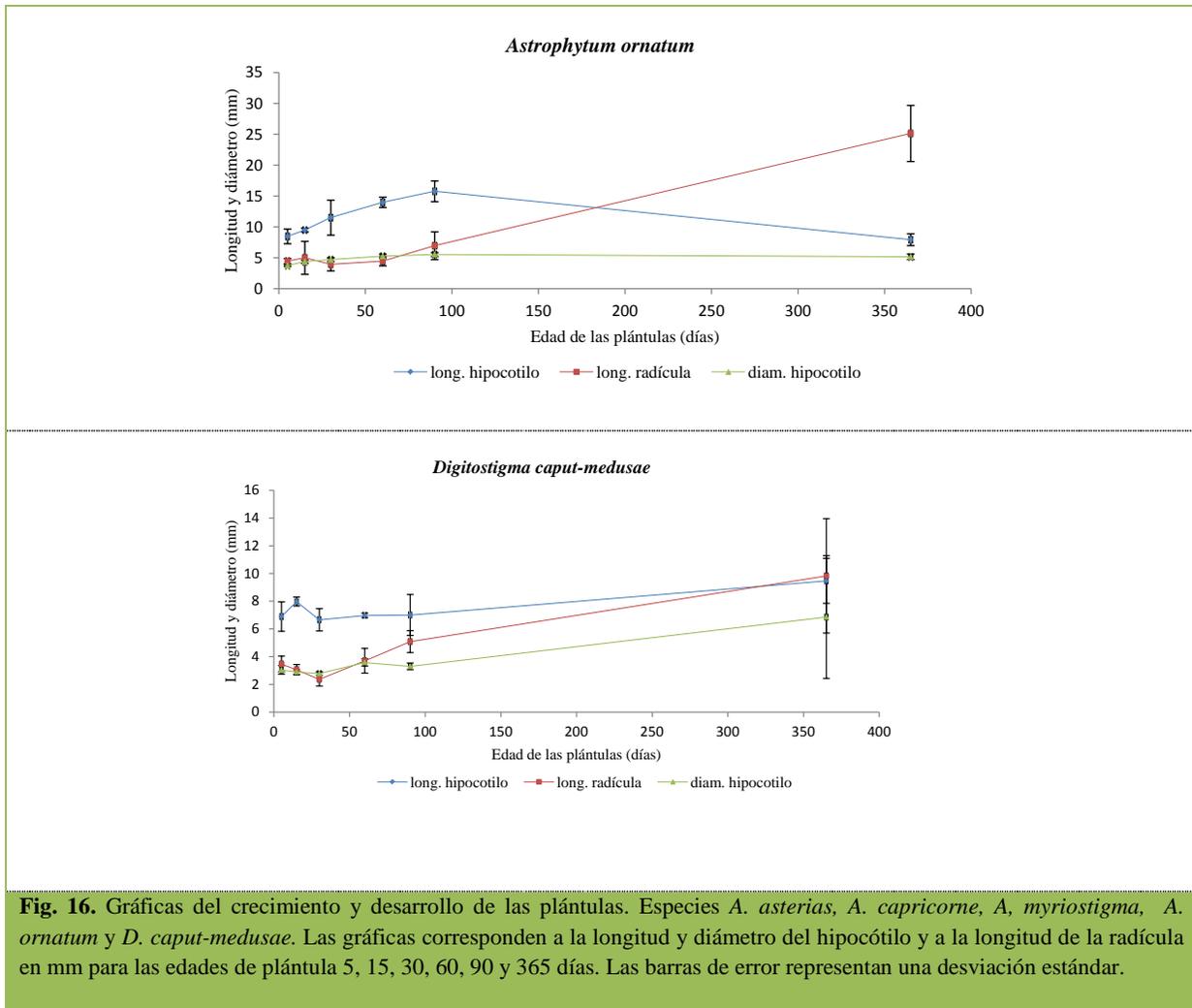


Astrophytum capricorne



Astrophytum myriostigma



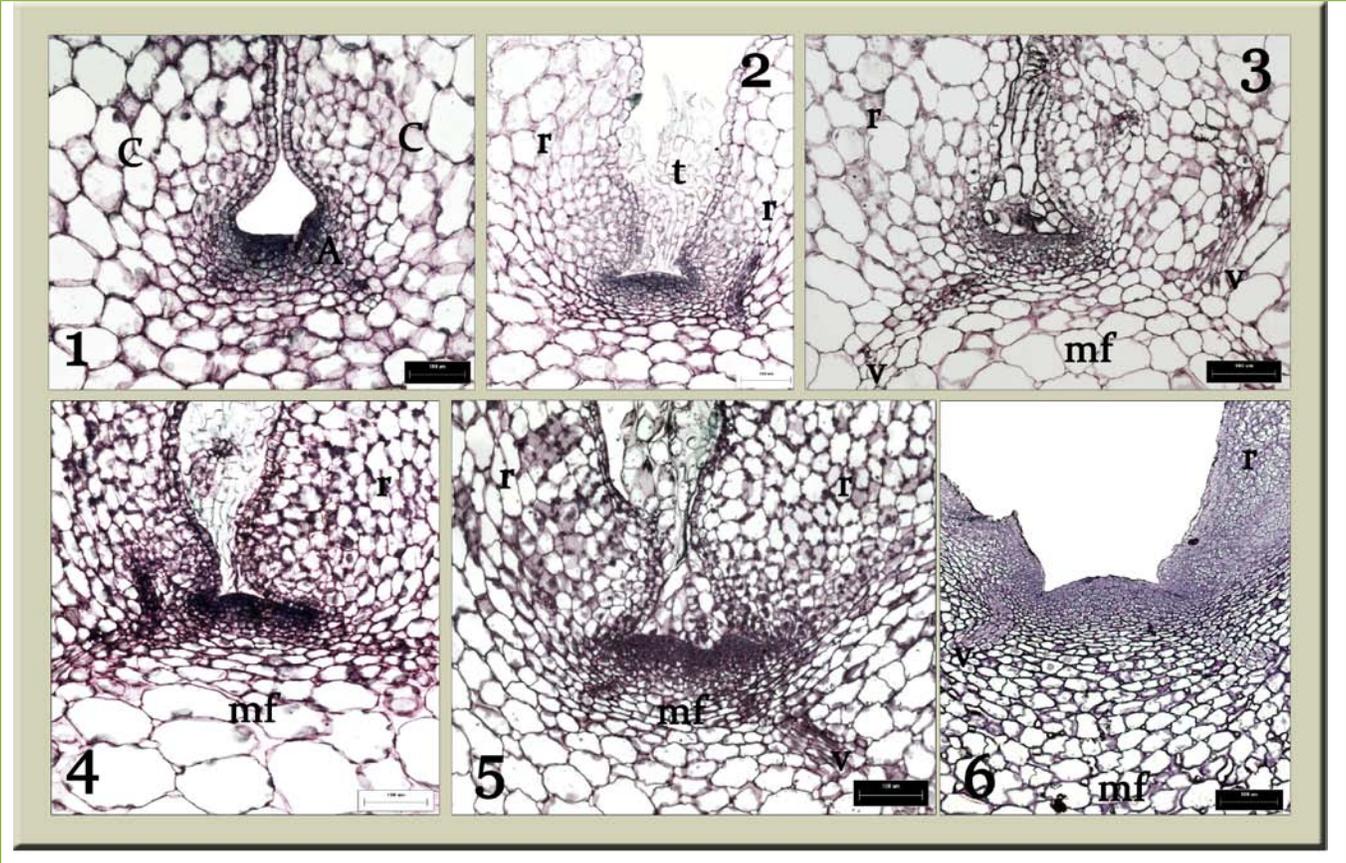


La aparición de los primeros estigmas o tricomas varió de especie en especie; la especie que los desarrollo más rápido fue *A. myriostigma* (desde los 15 días de edad) aún presentes sobre la superficie de la parte terminal del hipocótilo; seguida de *A. ornatum*, *A. capricorne* y *A. asterias* que los desarrollaron después de los 60 a 90 días (Fig. 15). La especie *D. caput-medusae* desarrolló los tricomas sobre sus tubérculos cuando estos fueron visibles entre los días 30 y 60 (Fig. 15).

La generación de las espinas inició en el día 15 en *A. capricorne* y después de los 60 días en las otras tres especies de *Astrophytum* (Fig. 15). En *Digitostigma caput-medusae* las areolas espiníferas iniciaron en el extremo superior de los tubérculos a partir del día 30 en que es visible el primero de los tubérculos.

Anatomía del MAT de los géneros Astrophytum y Digitostigma

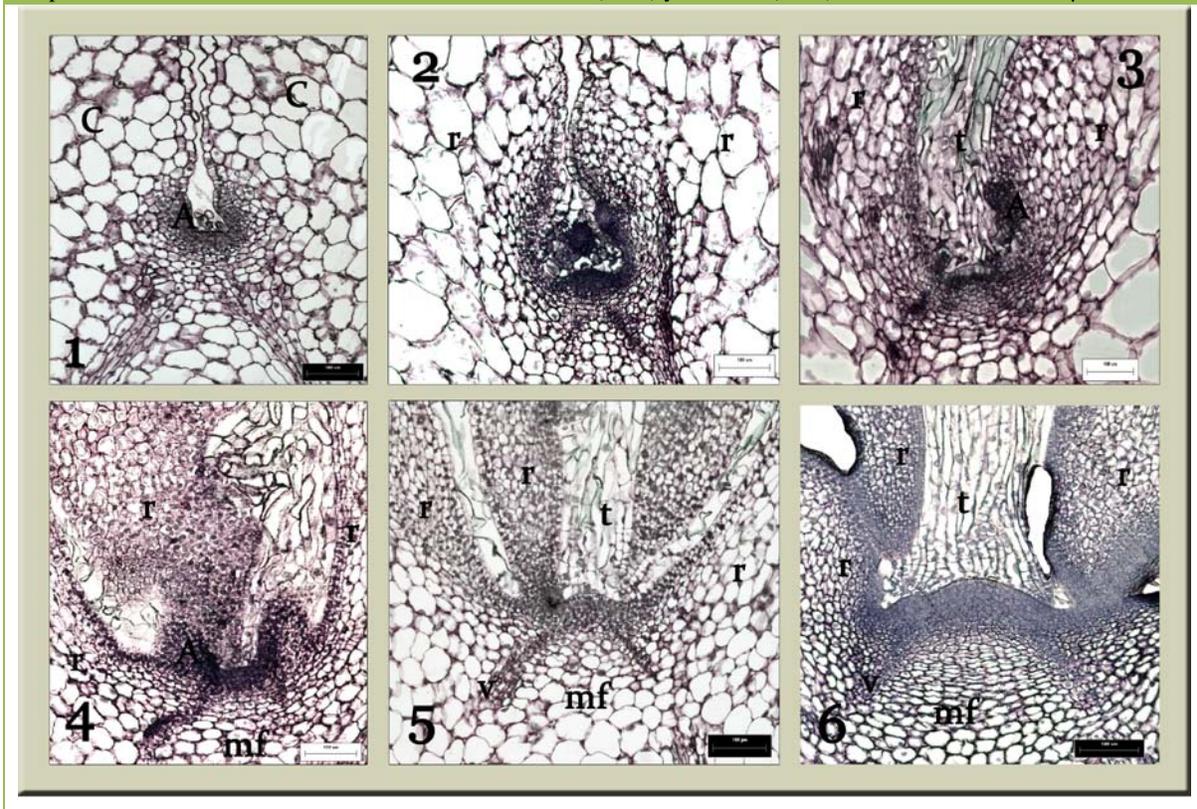
Fig. 17. Anatomía del meristemo apical del tallo de plántulas de *Astrophytum asterias*. Los números indican la edad de la planta: (1) meristemo apical de 5 días, (2) 15 días, (3) 30 días, (4) 60 días, (5) 90 días y (6) 365 días. Las letras indican: C=cotiledones, A=areolas nacientes, r=costillas, t=tricomas (o lana), mf=meristemo fundamental, v=haces vasculares. Al centro de las imágenes aparece siempre la estructura del domo con la capa de túnica uniestratificada y el corpus. Clasificación de estructuras modificada de Mauseth (1978) y Mauseth (2004). Barra de escala de 100 μm .



El MAT en plántulas de *Astrophytum asterias* de 5 días de edad presentó una estructura plana de 112.63 μm de diámetro y consistente en la región de la túnica y corpus como lo describe Mauseth (1978) y Mauseth (2004) para otras especies de Cactaceae (Fig. 17, 1). En el período de 15 días y hasta los 365, el domo se volvió convexo y alcanzó un diámetro máximo de 247.9 μm , incrementándose 2.2 veces en un año (Cuadro 9). Estas últimas mediciones coinciden con los que reporta Mauseth (1978) para diferentes taxones de cactáceas globosas, cilíndricas y columnares de diferentes tallas. En la región del corpus a los 5 días no pudieron ser identificadas claramente las zonas central, periférica y la zona de las bandas o nervaduras. Sin embargo, desde el día 15 y hasta el 365, se pudieron observar

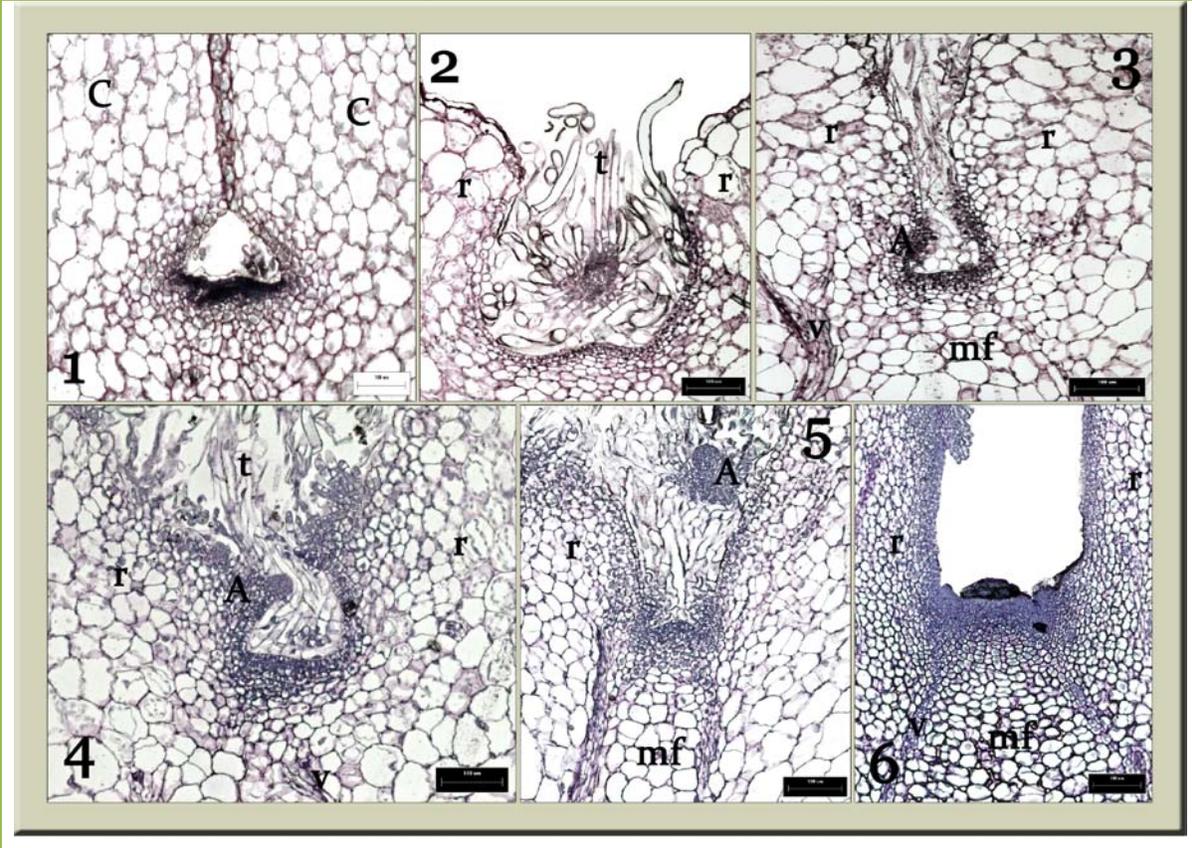
estas zonas, completándose la zonación del MAT según la estructura de tipo 3 que plantea Mauseth (1978). Las células centrales no pudieron ser identificadas en ningún tiempo. Desde el día 15 se inició el desarrollo de haces vasculares, ya que también las areolas y las costillas estaban en formación (Fig. 17, 2 en adelante).

Fig. 18. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de *Astrophytum capricorne*. Los números indican la edad de la planta: (1) meristemo apical de 5 días, (2) 15 días, (3) 30 días, (4) 60 días, (5) 90 días y (6) 365 días. Las letras indican: C=cotiledones, A=areolas nacientes, r=costillas, t=tricomas (o lana), mf=meristemo fundamental, v=haces vasculares. Al centro de las imágenes aparece siempre la estructura del domo con la capa de túnica uniestratificada y el corpus. Clasificación de estructuras modificada de Mauseth (1978) y Mauseth (2004). Barra de escala de 100 μ m.



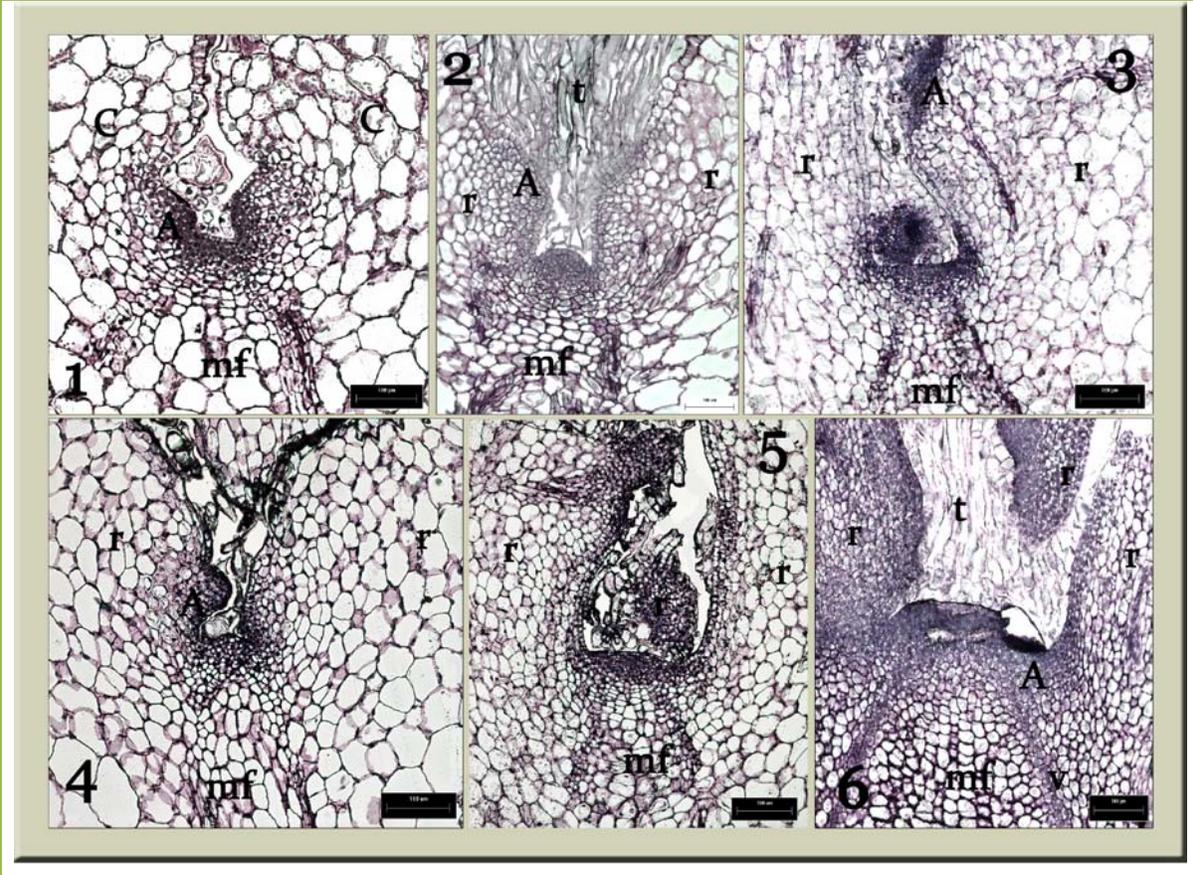
En el día 5, también fue notable la presencia de las primeras areolas nacientes y mechones de tricomas sobre la epidermis surgiendo cerca de la base de los cotiledones y a la orilla del domo que aparecen como estructuras densas con una capa de células de la túnica y una región subyacente muy activa en divisiones celulares (Fig. 17, 1). A los 15 días de edad y en adelante, ya fue notoria la producción de tricomas para protección de meristemo, que ya se mostró más expuesto por la misma separación que tuvieron las costillas en desarrollo que osciló entre 539.12 y 930.65 μ m (Fig. 17, 2 y Cuadro 9).

Fig. 19. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de *Astrophytum myriostigma*. Los números indican la edad de la planta: (1) meristemo apical de 5 días, (2) 15 días, (3) 30 días, (4) 60 días, (5) 90 días y (6) 365 días. Las letras indican: C=cotiledones, A=areolas nacientes, r=costillas, t=tricomas (o lana), v=haces vasculares. Al centro de las imágenes aparece siempre la estructura del domo con la capa de túnica uniestratificada y el corpus. Clasificación de estructuras modificada de Mauseth (1978) y Mauseth (2004). Barra de escala de 100 μ m.



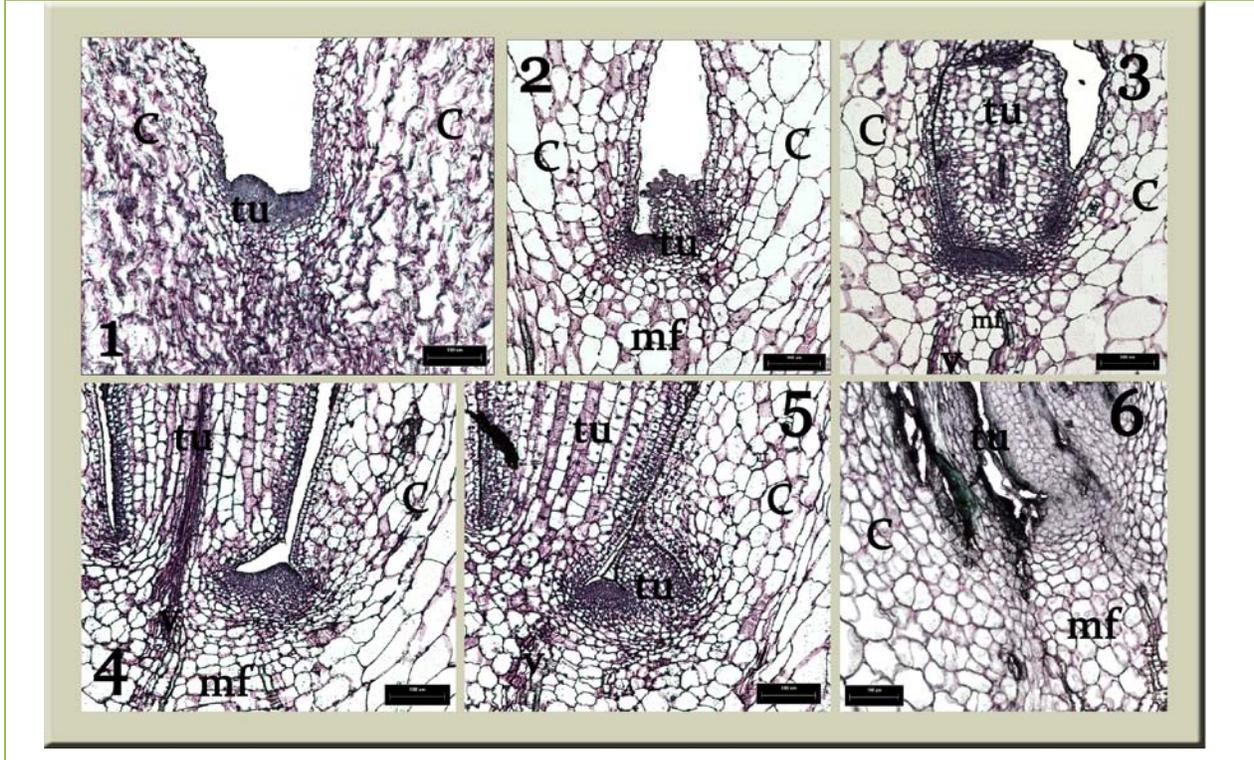
El MAT en plántulas de *Astrophytum capricorne* a los 5 días de edad presentó una estructura plana de 63.48 μ m de diámetro y consistente en la región de la túnica y corpus (Fig. 18, 1 y Cuadro 9). En el período de 15 días y hasta los 365, el domo se volvió convexo y alcanzó un diámetro máximo de 250.37 μ m (incrementándose 3.94 veces en un año) y una altura máxima de 266.85 μ m (Cuadro 9). Estas últimas mediciones también coinciden con los que reporta Mauseth (1978) para diferentes taxones de cactáceas globosas, cilíndricas y columnares de diferentes tallas. En la región del corpus a los 5 días no pudieron ser identificadas claramente las zonas central, periférica y la zona de las bandas o nervaduras. Sin embargo, desde el día 15 y hasta el 365, se pueden observar estas zonas, completándose también para este especie la zonación del MAT según la estructura de tipo 3 que plantea Mauseth (1978).

Fig. 20. Anatomía del meristemo apical del tallo en plántulas de *Astrophytum ornatum*. Los números indican la edad de la planta: (1) meristemo apical de 5 días, (2) 15 días, (3) 30 días, (4) 60 días, (5) 90 días y (6) 365 días. Las letras indican: C=cotiledones, A=areolas nacientes, r=costillas, t=tricomas (o lana), mf=meristemo fundamental, v=haces vasculares. Al centro de las imágenes aparece siempre la estructura del domo con la capa de túnica uniestratificada y el corpus. Clasificación de estructuras modificada de Mauseth (1978) y Mauseth (2004). Barra de escala de 100 μ m.



A los 5 días de edad de la plántula y en adelante surgen las primeras areolas y fue notoria la producción de tricomas para protección de meristemo ubicado primero entre los cotiledones con una separación de 330.98 μ m y después no esta separación no pudo ser estimada (Fig. 18, 2).

Fig. 21. Anatomía del meristemo apical del tallo de plántulas de *Digitostigma caput-medusae*. Los números indican la edad de la planta en días: (1) 5, (2) 15, (3) 30, (4)60, (5) 90 y (6) 365 días. Las letras indican: C=cotiledones, tu=tubérculos, mf=meristemo fundamental, v=haces vasculares. Al centro de las imágenes aparece siempre la estructura del domo con la capa de túnica uniestratificada y el corpus. Clasificación de estructuras modificada de Mauseth (1978) y Mauseth (2004). Barra de escala de 100 μ m.



El MAT en plántulas de *Astrophytum myriostigma* a los 5 días de edad presentó una estructura convexa con un diámetro de 149.72 μ m y consistente en la región de la túnica y corpus (Fig. 19, 1). Solo hasta el día 60 podría sugerirse la presencia de una zonación completa correspondiente a la estructura tipo 3 del MAT propuesta por Mauseth (1978).

Desde los 5 días también fue notable la presencia de la primer areola (Fig. 19, 1), que aparece como una pequeña estructura densa con una capa de células de la túnica y una región subyacente muy activa en divisiones celulares y densamente teñida del lado izquierdo de un domo casi plano. A los 15 días de edad de la plántula y en adelante, ya fue notoria la producción de tricomas para la protección de meristemo, que ya se mostró más expuesto por la misma gran separación que tuvieron las costillas en desarrollo (Fig. 19, 2).

El MAT en plántulas de *Astrophytum ornatum* a los 5 días de edad presentó una estructura ligeramente convexa con un diámetro de 70.91 μ m y al igual que en las otras especies de *Astrophytum*, consistente en la región de la túnica uniestratificada y corpus

(Fig. 20, 1). El incremento en el diámetro del MAT de esta especie fue de 4.68 veces, alcanzando los 331.85 μm y colocándose como el tercero más grande dentro de las especies de *Astrophytum* y por debajo de *A. myriostigma* que tuvo el MAT más ancho. Aunque no pudieron ser identificadas las células madre centrales, la estructura de este MAT pudo ser reconocida como de tipo 3 por su zonación completa en plántulas de 365 de edad (Mauseth, 1978). Los tricomas presentes desde el día 5, también fueron más abundantes desde el día 5 y hasta el día 365, pues el espacio entre cotiledones y después entre las costillas fue muy amplio, exponiendo considerablemente al domo (Fig. 20, 6).

La estructura del meristemo plano de *D. caput-medusae* en plántulas de 5 días de edad también consistió de una túnica monoestratificada y la región del corpus (diámetro de 61.82 μm). El domo convexo desde el día 15 y hasta el día 365 mostró una zonación completa de una estructura tipo 3 del MAT, según lo propuesto por Mauseth (1978). El diámetro inicial del MAT fue de 61.82 μm y el final fue de 109.95 μm , con un incremento de 1.77 veces en un año de crecimiento de la plántula. Con estos datos se mostró que *D. caput-medusae* tuvo el MAT más pequeño entre las especies de ambos géneros y el que tuvo el más lento crecimiento. No se desarrollaron areolas ni costillas como en las especies de *Astrophytum* sino tubérculos (Fig. 21) y estos iniciaron su formación desde antes del día 5 pero fueron visibles por encima de los cotiledones hasta el día 30. El desarrollo de estos tubérculos tuvo una filotaxia en espiral, produciéndose uno a uno a ambos lados del domo y en posiciones opuestas cada vez (Fig. 21). Al producirse un tubérculo se sitúa sobre el meristemo cubriéndolo y presionándolo hacia abajo (Fig. 21, 3 y 5), luego conforme se va alargando el tubérculo, se produce un desplazamiento del meristemo hacia el lado opuesto, produciéndose así, una compresión del meristemo dando la apariencia de un domo convexo sumamente compacto (Fig. 21, 3, 4 y 5). Cabe señalar que esta especie presentó areolas espiníferas incipientes sobre la punta de los tubérculos desde el día 15, esto a diferencia de las especies del género *Astrophytum*, que presentan areolas sobre el borde de las costillas nacientes también desde el día 15. En *D. caput-medusae* no se desarrollaron tricomas en ninguna etapa incluida en este estudio, lo que contrasta con los tricomas siempre presentes en *Astrophytum*. Con respecto a las estructuras llamadas espinas setosas o barbas de color amarillo que cubren el ápice de *D. caput-medusae* en plantas adultas, no se registraron en las edades de plántulas de este estudio.

Cuadro 11. Mediciones de las características distintivas de los meristemos apicales del tallo de las especies *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. myriostigma*, *A. ornatum* y *D. caput-medusae*. Correspondientes a la longitud total del domo, Altura sobre las axilas de los cotiledones y distancia entre cotiledones. Mediciones en μm .

Muestra		Meristemo	Espacio entre cotiledones
Especie	Edad (días)	Diámetro (μm)	Distancia (μm)
<i>A. asterias</i>	5	112.63	539.12
	15	172.65	540.39
	30	111.78	72.63
	60	170.21	930.65
	90	158.37	884.95
	365	247.9 (2.2)	ND
<i>A. capricorne</i>	5	63.48	330.98
	15	124.91	1195.7
	30	117.46	436.76
	60	98.82	ND
	90	59.47	ND
	365	250.37 (3.94)	ND
<i>A. myriostigma</i>	5	149.72	293.4
	15	209.37	286.38
	30	105.02	220.38
	60	90.17	>679.83
	90	96.077	ND
	365	407.14 (2.7)	ND
<i>A. ornatum</i>	5	70.91	414.42
	15	114.19	920.58
	30	142.15	>210.21
	60	87.87	513.48
	90	167.77	ND
	365	331.85 (4.68)	>654.90
<i>D. caput-medusae</i>	5	61.82	828.25
	15	48.14	1349.3
	30	109.09	>1533.78
	60	43.38	>1888.41
	90	79.48	>1921.55
	365	109.95 (1.77)	ND

Los MAT del género *Astrophytum* y de *Digitostigma* presentan una sola capa de células de la túnica, caracterizada en todas las edades de todas las muestras. A partir de esta única capa de túnica se diferencian células epidérmicas ordinarias y los tricomas que cubren la zona del domo del meristemo desde los cinco días de edad en plántulas de *A. capricorne*, *A. myriostigma* y *A. ornatum*. En *A. asterias* estos tricomas aparecieron hasta los 15 días de edad y no se registraron en *D. caput-medusae* en ninguna edad de las

plántulas por lo que se sugiere que los tubérculos al desarrollarse en forma opuesta y cerrada son los que protegen al meristemo apical del tallo. El corpus en ambos géneros estuvo compuesto de aproximadamente siete capas de células con divisiones en varios planos, nucleadas y sin mucha organización en todos los casos. Desde etapas muy tempranas (5 días y 15 días de edad de las plántulas), se presenta el desarrollo del procambium a ambos lados del meristemo en todas las especies.

En las especies de *Astrophytum*, el MAT presentó una forma típica de domo, con un incremento de la longitud entre 2.2 y hasta 4.68 veces su tamaño entre las plántulas de *A. asterias* y *A. ornatum*, respectivamente (Cuadro 9), mientras que en *D. caput-medusae* éste solo se incrementa menos de dos veces en diámetro a lo largo del primer año, incremento relacionado con su lento crecimiento y ausencia de costillas. Los MAT de *Astrophytum* y *D. caput-medusae* se pueden clasificar como grandes de acuerdo con la propuesta de Mauseth (2004).

Conclusión

El tamaño y estructura de las plántulas y los cotiledones reducidos de las especies de *Astrophytum* fueron caracteres derivados, esto con respecto a los que se encuentran en otras subfamilias como Pereskioideae y Opuntioideae. Mientras que las plántulas de *D. caput-medusae* con sus grandes cotiledones e hipocótilo delgado y cilíndrico, fueron más afines a las plántulas de taxones de las subfamilias de Cactaceae arriba mencionadas. En todas las especies se encontró que al momento de la germinación y hasta los 90 días de edad el hipocótilo fue hipogeo. Sin embargo, con plántulas de un año de edad se encontró que las especies *A. asterias*, *A. capricorne* y *D. caput-medusae* desarrollaron tallos total o parcialmente hipogeos por efecto del hipocótilo y raíces contráctiles. Las plántulas más pequeñas de ambos géneros fueron las de *A. asterias*, seguidas de *D. caput-medusae*, *A. capricorne*, *A. myriostigma* y finalmente la más grande correspondió a la especie *A. ornatum*. Sin embargo, en cuanto a diámetro de MAT se refiere, *D. caput-medusae* tuvo los valores más bajos, seguida de *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. ornatum* y los valores más altos los mostró *A. myriostigma*. Se encontró que *D. caput-medusae* es la única especie de Cactaceae que no presenta tricomas para proteger el meristemo apical del tallo, al menos

desde que la plántula emerge y hasta después de un año de edad, en lugar de eso los tubérculos en desarrollo son los que asumen la función de protección. Todas las especies del género *Astrophytum* y *D. caput-medusae* presentaron un MAT con una sola capa de células de la túnica, un corpus bien estructurado y no se identificaron células madre. Los MAT de ambos géneros presentaron la estructura tipo 3, propuesta por Mauseth (1978).

Conclusiones generales

De los 6 loci diseñados para *Astrophytum asterias*, sólo dos pudieron ser amplificados en las muestras de tejidos vegetativos de 17 individuos de *Digitostigma caput-medusae*, lo que reflejó la relación cercana entre ambos taxones propuesta por diversos autores desde hace varios años. En lo que respecta a la diversidad de alelos, la presencia de 14 alelos en 17 individuos fue una cantidad considerable, pero no comparable con lo encontrado en otras especies de cactáceas como *Astrophytum asterias* y *Ariocarpus bravoanus*. Los datos no fueron suficientes como para saber si la especie se encuentra en condiciones endogámicas tales que puedan comprometer su permanencia a mediano y largo plazo. Los individuos muestreados compartieron los mismos alelos para ambos loci, lo que sugiere que proceden de la misma localidad. La distribución de los alelos dentro de las muestras indicó que sólo uno de los individuos muestreados fue heterócigo para ambos loci y que al menos 7 de los individuos restantes fueron diferentes por su combinación de alelos, aunque para un solo loci. Mientras que al menos 8 fueron individuos idénticos por la combinación de alelos de ambos loci, e incluso podrían ser clones o cruza de los otros siete individuos con mayor variación. Con este panorama, resulta prioritario caracterizar más secuencias de microsatélites específicas para *D. caput-medusae* para obtener información más amplia acerca de la variación de los mismos 17 individuos incluidos en este estudio y al mismo tiempo, es necesario contar con más individuos para aumentar las probabilidades de encontrar heterócigos. No se descarta que el muestreo tuviera una gran influencia en los resultados pues se trató de una muestra muy pequeña, aunque la población original no se mostraba muy amplia desde un inicio.

Como una medida de conservación a corto plazo y apoyándonos en los resultados de este estudio, se propone que los 17 individuos sean reproducidos primero vegetativamente por medio de injertos, pues se ha probado que es una técnica efectiva y podría ayudar a producir una gran cantidad de semillas y plántulas en poco tiempo.

Las secuencias de desarrollo de las plántulas en las especies de ambos géneros sugieren que después de la germinación el desarrollo del hipocótilo es epigeo, al menos hasta los 90 días de edad en todas las especies. Sin embargo, en tres especies se observó un cambio paulatino que condujo a la generación de un tallo total o parcialmente hipogeo, esto

último se debió a la presencia de hipocótilos y raíces contráctiles en *Astrophytum asterias*, *A. capricorne* y *D. caput-medusae*. Esto deja a *Astrophytum myriostigma* y *A. ornatum* con plántulas epigeas desde un inicio y hasta que alcanzan la madurez. En lo que respecta a los meristemos apicales, se encontró que todas las especies tuvieron meristemos tipo 3, según la clasificación de Mauseth (1978), esto quiere decir que todos los meristemos consistieron de una sola capa de células de la túnica, un corpus bien estructurado y no se pudieron identificar las células madre. También se reportó que *D. caput-medusae* es la única especie hasta ahora reportada que no produce tricomas para proteger al meristemo apical del tallo y que esta función la cumplen los tubérculos en desarrollo. Esto último no coloca a *Astrophytum* y *Digitostigma* más que en su lugar como parte de la familia Cactaceae y aún queda por discutir si *Digitostigma* es parte de *Astrophytum* aunque poco, pues la evidencia molecular, morfológica y anatómica no parece indicar lo contrario. Esta discusión debe ser abordada con abundancia en trabajos posteriores y que mejor que sea a la luz de la evidencia encontrada en trabajos como esta tesis.

Bibliografía general

- Aguilar-Morales, G., Martínez-Peralta, C., Feria-Arroyo, T.P., Golubov, J. y M.C. Mandujano. 2011. Distribución geográfica del género *Ariocarpus* Scheidweiler (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **56**: 49-63.
- Álvarez, R., Godínez Álvarez, H., Guzmán, U. y P. Dávila. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **75**: 7-16.
- Anderson, M. 1997. Grafting succulents. *Cactus and Succulent Journal* **69**: 17-25.
- Arakaki, M., Soltis, D.E., Soltis, P.S. y P.R. Speranza. 2010. Characterization of polymorphic microsatellite loci in *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *American Journal of Botany*. E17-E19.
- Arévalo, G.M. 2000. Análisis entre la relación patrón-injerto entre cactáceas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Estado de México.
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L. y C. Trejo. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3165-3174.
- Bárceñas, R.T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas*. CONABIO. **68**: 11-15.
- Bárceñas, R.T., Yesson, C., y J. Hawkins. 2011. Molecular systematic of the Cactaceae. *Cladistics* **27**: 470-489.
- Barthlott, W. y D. Hunt. 1993. *Cactaceae. The families and genera of vascular plants*. Vol. II. K. Kubitzki. USA.
- Bautista-Alvarado, V. 2007. Efecto de la hidratación-deshidratación en la germinación de semillas de cinco especies de Cactáceas del Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85 pp.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. CONABIO. **32**: 1-5.
- Bezaury-Creel, J., D. Gutiérrez Carbonell *et al.* 2009. Áreas naturales protegidas y desarrollo social en México. **En**: *Capital natural de México*. Vol. II: *Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO. México. 385-431.
- Brailovsky Signoret, D. 2008. Diversidad, distribución geográfica y conservación de Cactaceae en el desierto chihuahuense. Región de Mazapil, Zacatecas, y áreas adyacentes. Tesis de Maestría. Instituto de Biología, UNAM. 117 pp.

- Bravo Espinosa, Y. M. 2011. Estudio demográfico de *Astrophytum capricorne* (A. DIETRICH) BRITTON y ROSE en Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. pp 72.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. I. UNAM. México. 743 pp.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 2002. *El interesante mundo de las cactáceas*. Fondo de Cultura Económica. México. 233 pp.
- Butterworth, C.A. Cota-Sánchez, J.H. y R.S. Wallace. 2002. Molecular systematics of the tribe Cactaeae (Cactaceae: Cactoideae): a phylogeny base don *rpl16* intron sequence variation. *Systematic Botany* **27**: 257-270.
- Cardarelli, M., Borgognone, D. y G. Colla. 2010. In vitro propagation of *Obregonia denegrii* Frič. (Cactaceae). *Propagation of Ornamental Plants* **10**: 29-36.
- Calderón-Gil, E.B. 2007. Morfogénesis in vitro de *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, y *Mammillaria sanchez-mejorada* González, Cactáceas endémicas y en peligro de extinción. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 67 pp.
- Cappers, R.T.J., Neef, R. y R.M. Bekker. 2009. *Digital Atlas of Economic Plants*. University of Groningen (The Netherlands) and the Deutsches Archäologisches Institut (DAI, Berlin, Germany).
- Castro-Gallo, I.A., Meza-Rangel, E., Pérez-Reyes, M.E. y Pérez-Molphe-Balch, E. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientia Naturae* **4**: 5-24.
- Chávez, A. V. M. y I. A. Rubluo. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. **En**: Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R. y T. S. Elias (Eds.) *Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques*. Instituto de Biología. UNAM. 123-131.
- CITES. 2013. *Appendices I, II y III to the convention on the international trade in endangered species of wild fauna and flora*. US Fish y Wildlife Services, Washington, DC. 47 pp.
- Comparán-Sánchez, S. y Luna-Martínez, J. 2004. Propagación por cultivo de tejidos de la especie *Astrophytum capricorne* Britton *et* Rose. **En**: Hernández, R.M.P., Cházaro, B.M.J., Vázquez, G.J.A. (Eds.). Libro de resúmenes IV Congreso Mexicano, Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras suculentas. Guadalajara, Jalisco, México.
- CONABIO. 2000. *Estrategia nacional sobre la biodiversidad de México*. CONABIO. México.

-CONABIO-CONANP-SEMARNAT. 2008. *Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal: Objetivos y metas*. México.

-CONABIO. 2010. Medusita (*Digitostigma caput-medusae*). Fichas de especies mexicanas. CONABIO-CONANP. México, D.F. Compilado por Carlos Gerardo Velazco Macías.

-Cutler, D.F., Botha, C.E.J. and Stevenson, D.W. 2007. Plant anatomy, an Applied approach. *Blackwell Publishing*. 313 pp.

-Das, A.B., Mohanty, S y P. Das. 2000. Cytophotometric estimation of 4C DNA content and chromosome analysis in four species of *Astrophytum* Lem. of the Family Cactaceae. *Cytologia. The Japan Mendel Society* **65**: 141-148.

-Estrada-Luna, A.A., López-Peralta, C. y E. Cárdenas-Soriano. 2002. In vitro micrografting and the histology of graft unión formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp.*). *Scientia Horticulturae* **92**: 317-327.

-Evert, R.F. (Editor). 2006. *Esau's Plant Anatomy*. John Wiley y Sons, Inc. 607 pp.

-Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* **3**: 176-183.

-Flores Renteria, D. Y. 2008. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 34-51.

-Flores, J., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., Ceroni-Stuva, A., Dávila-Aranda, P., Galíndez, G., Gurvich, D., León-Lobos, P., Ordóñez, C., Ortega-Baes, P., Ramírez-Bullón, N., Sandoval, A., Seal, C.E., Ullian, T. y H.W. Pritchard. 2011. Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 79-88.

-Flores Pérez, S. 2009. Soluciones nutritivas en la producción de injertos en cactáceas. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 145 pp.

-Ganong, W.F. 1898. Contributions to a knowledge of the morphology and ecology of the Cactaceae: II. The comparative morphology of the embryos and seedlings. *Annals of Botany* **12**: 424-451.

-García-Gómez, V. 2009. Análisis de la diversidad genética de *Parkinsonia praecox* (Manteco) en Colonia San Martín, Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM. México.

-García-Rubio, O. y G. Malda-Barrera. 2010. Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural hábitat. *HortScience* **45**: 934-938.

- Garza-Padrón, R.A., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E., Oranday-Cárdenas, A., Rivas-Morales, C., Núñez-González, M.A. y M.P. Barrón-González. 2010. Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica*. 111-121.
- Gaston, K.J. 2005. Biodiversity and extinction: species and people. *Progress in Physical Geography* **29**: 239-247.
- Goldstein, D.B. y C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites, Evolution and Applications*. Oxford University Press. USA. 352 pp.
- González Caballero, O. 2008. Cultivo *in vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass y R.A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM.
- González Rodríguez, H y Cantú Silva, I. 2001. Adaptación a la sequía de plantas arbustivas de matorral espinoso tamaulipeco. *Ciencia UANL* **4**.
- Guzmán-Cruz, U.L., Arias Montes, S. y P. Dávila. 2003. *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. UNAM-CONABIO. México. 315 pp.
- Guerrant, E.O. Jr., Havens, K. y M. Maunder (Edit.). 2004. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press. U.K. 504 pp.
- Harman, L. y Kester. 2002. *Plant propagation, principles and practices*. 7th. Edition. Ed. Hudson, T. Prentice Hall. New Jersey, USA.
- Hernández-Alva, M., Chávez Ávila, V.M. y Nevárez de los Reyes, M. 2011. *Digitostigma caput-medusae* Velazco et Nevárez. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **56**:
- Hubstenberger, J.F., Clayton, P.W. y C.G. Phillips. 1992. Micropropagation of Cacti (Cactaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **20**: 49-68.
- Hughes, S.L., Rodriguez, V.M., Hardesty, B.D., Bárcenas Luna, R.T., Hernández, H.M., Robson, R.M. y J.A. Hawkins. 2008. Characterization of microsatellite loci for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Molecular Ecology Resources* **8**: 1068-1070.
- Hunt, D. 2003a. Weirdest of them all? –New genus or...? Notulae Systematicae Lexicon Cactearum Spectantes III Cact. Syst. Init.; *Bulletin of the International Cactaceae Systematics Group* **15**: 1-2, 5-6.
- Hunt, D. 2003b. Notulae Systematicae Lexicon Cactearum Spectantes III Cact. Syst. Init.; *Bulletin of the International Cactaceae Systematic Group* **16**.
- Hunt, D. 2005. Rule-changes validate *Digitostigma*. *Cactaceae Systematics Initiatives* **20**: 4.

- IUCN-UNEP-WWF. 1980. *World conservation strategy: living resource conservation for sustainable development*. Gland, Switzerland. IUCN. 77 pp.
- IUCN-UNEP-WWF. 1991. *Caring for the Earth: A strategy for sustainable living*. Gland, Switzerland. IUCN.
- IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 September 2013.
- Kiesling, R. 2007. Nomenclatura de *Digitostigma caput-medusae* (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **52**: 20-24.
- Kwiatkowska, D. 2004. Structural integration at the shoot apical meristem: model, measurements, and experiments. *American Journal of Botany* **91**: 1277-1293.
- Kleszewski, K.P. y H. Hooek. 2007. El género *Astróphytum* Lemaire. *Piante Grasse* (Speciale, Suplemento al No. 1). 98 pp.
- Lande, R. 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology* **40**: 259-269.
- Leff, E. 2007. La Complejidad Ambiental. *Polis, Revista de la Universidad Bolivariana* **5**.
- Leng, C.E. y C.L. Keng. 2007. Induction of somatic embryogenetic callus from the leaves of *Pereskia grandifolia*. *Biotechnology* **6**: 45-48.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *The annals of Mathematical Statistics* **20**: 91-94.
- Lizalde-Viramontes, H., Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M.E. y Dávila-Figueroa, C. 2004. Propagación por técnicas de cultivo de tejidos de cactáceas del género *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*. En: Hernández, R.M.P., Cházaro, B.M.J., Vázquez, G.J.A. (Eds.). Libro de resúmenes IV Congreso Mexicano, Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras suculentas. Guadalajara, Jalisco, México.
- Llorente-Bousquets, J. y S. Ocegueda. 2008. Estado del conocimiento de la biota. **En:** *Capital natural de México*. Vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México. 283-322 pp.
- López-Flores, D. y Golubov, J. 2011. Demografía de *Astrophytum myriostigma* Lem. (Cactaceae). Memorias del III Congreso Mexicano de Ecología, 2011. Resúmenes de Presentaciones Orales. Veracruz, México. pp 304.
- Loza-Cornejo, S. y Terrazas, T. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *Journal of Plant Research* **116**: 27-35.

- Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., López-Mata, L. y C. Trejo. 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia* **28**: 83-89.
- Malda, G., Suzán, H. y R. Backhaus. 1998. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* **81**: 71-87.
- Marinelli, J. (Editora). 2006. *Planta*. Instituto de Biología, UNAM-Royal Botanical Gardens Kew. Altea-Santillana Ediciones Generales. México. 512 pp.
- Martínez-Ávalos, J.G., Mandujano, M.C., Golubov, J., Soto, M. y Verhulst, J. 2004. Análisis del Método de Evaluación de Riesgo (MER) del “Falso peyote” (*Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem.) en México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **49(4)**: 118-127.
- Martínez-Ávalos, J.G. 2007. Dinámica poblacional del falso peyote *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. (Cactaceae), una especie amenazada del Noreste de México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. 122 pp.
- Mata Rosas, M., Monroy de la Rosa, M.A., Moebius Goldammer, K. y V.M. Chávez Ávila. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Development Biology* **37**: 400-404.
- Maunder, M., Havens, K., Guerrant, E.O. Jr. y D.A. Falk. 2004. Ex situ methods: a vital but underused set of conservation resources. En: Guerrant, E.O. Jr., Havens, K. y M. Maunder (Edit.). 2004. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press. U.K. 504 pp.
- Mauseth, J.D. 1978. An investigation of the morphogenetic mechanism which control the development of zonation in seedling shoot apical meristems. *American Journal of Botany* **65**: 158-167.
- Mauseth, J.D. 2004. Giant shoot apical meristems in cacti have ordinary leaf primordia but altered phyllotaxy and shoot diameter. *Annals of Botany* **94**: 145-153.
- Mauseth, J.D. 2006. Structure-function relationship in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* **98**: 901-926.
- Mendoza Madrigal, G. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (DE CANDOLLE) Weber (Cactaceae), especie amenazadas de extinction. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 91 pp.
- Moebius-Goldammer, K., Mata, M. y V. M. Chávez. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (LEM.) K. SCHUM. (Cactaceae), an endangered and Mexican species. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* **39**:

388-393.

-Murashig, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 437-497.

-Muro Pérez, G. 2011. Asociaciones nodriza-protégida y germinación de cactáceas en Durango y Tamaulipas. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. 82 pp.

Navarrete Vargas, D.N. 2008. Estructura genética de la nutria de río (*Lontra longicaudis*) en la reserva de Montes Azules, Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM. México. 56 pp.

-Navarro, M. del C. y A.P. Deméneghi. 2007. Germinación de semillas y efecto de las hormonas de crecimiento en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. *Zonas Áridas* **11**: 233-239.

Niklas, K.J. y J. Mauseth. 1981. Relationships among shoot apical meristem ontogenic features in *Trichocereus pachanoi* and *Melocactus matanzanus* (Cactaceae). *American Journal of Botany* **68**(1): 101-106.

-Oldfield, S. 1997. *Cactus and succulent plants: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 212 pp.

-ONU. 1992. *Convenio sobre la Diversidad Biológica*. 30 pp.

-Parra, F., Casas, A., Peñaloza-Ramírez, J.M., Cortés-Palomec, A.C., Rocha-Ramírez, V. y A. González-Rodríguez. 2010. Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Valley, Mexico. *Annals of Botany* **106**: 483-496.

Pérez Molphe Balch, E., Pérez-Reyes, M.E., Villalobos-Amador, E., Meza-Rangel, E., Morones-Ruíz, L.R. y H.J. Lizalde-Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell and Development Biology* **34**: 131-135.

-Pertoldi, C., Bach, L.A. y V. Loeschcke. 2008. On the brink between extinction and persistence. *Biology Direct* **47**: 1-6.

-Puente Alarcón, J.E. 2009. Efecto del injerto intermedio en la producción de plantas enanizadas de marañón (*Anacardium occidentale* L.); fase de vivero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador. 71 pp.

-Ramírez-Malagón, R., Aguilar-Ramírez, I., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J.L., Nuñez-Palenius, H.G. y N. Ochoa-Alejo. 2007. In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental*

Biology-Plant **43**: 660-665.

-Reyes Santiago, J. 2009. Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas, manual práctico. CONAFOR. México. 110 pp.

-Reza, M. 2008. Aspectos demográficos de una población de *Astrophytum myriostigma* Lemaire (1839) (Cactaceae) en la Sierra El Sarnoso, Durango, México. Tesis de Licenciatura, Universidad Juárez del Estado de Durango.

-Rocha, M. y J. Gasca. 2007. Ecología molecular y conservación (Capítulo 8). **En:** Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. *Ecología Molecular*. SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO. México. 592 pp.

-Rojas-Aréchiga, M., Mandujano, M.C. y J.K. Golubov. 2013. Seed size and photoblastism in species belonging to the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Journal of Plant Research* **126**: 373-386.

-Rubluo, A., Marín-Hernández, T., Duval, K., Vargas, A., y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultures *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* **95**: 341-349.

-Rzedowski, J. 1991. El endemismo en la Flora Fanerogámica Mexicana: Una Apreciación Analítica Preliminar. *Acta Botánica Mexicana* **15**: 47-64.

-Santos Díaz, M.S., Martín del Campo Macías, J.M., Arredondo Gómez, A. y M.L. Santos Díaz. 2001. Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (Cactácea) *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex* **24**: 133-138.

-Sánchez Martínez, E., Hernández Martínez, M.M., Hernández-Oria, J.G. y L.E. Torres Galeana. 2008. Nota: *Mammillaria herrerae* Werderm., en el vórtice de la extinción. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **53**: 123-127.

-Sánchez Salas, J., Flores, J. y Martínez García, E. 2006. Efecto del tamaño de la semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. *Interciencia* **31**: 371-375.

-Sánchez-Salas, J., Muro Pérez, G., Estrada Castellón, E. y García Aranda, M. 2010. Registro de dos nuevas localidades y reubicación de una de ellas de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae) en Durango, México. *Bot. Res. Inst. Texas* **4**: 741-745.

-SEMARNAT-CONANP. 2007. *Estrategia de cultura para la conservación 2006-2012*. SEMARNAT-CONANP. México.

-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-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”. Diario Oficial de la Federación 30 de diciembre: 130 pp.

-Singh Bhau, B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from roots explants. *Scientia Horticulturae* **81**: 337-344.

-Starling, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus and Succulent Journal* **2**: 69-70.

-Strong, A.W. y P.S. Williamson. 2007. Breeding system of *Astrophytum asterias* an endangered cactus. *The Southwestern Naturalist* **52**: 341-346.

-Stuppy, W. y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* **10**: 85-88.

-Terry, M. K. 2005. A tale of two cacti: Studies in *Astrophytum asterias* and *Lophophora williamsii*. Doctor of Philosophy. Texas A&M University. 178 pp.

-Terry, M., Pepper, A.E. y J.R. Manhart. 2006. Development and characterization of microsatellite loci in endangered *Astrophytum asterias* (Cactaceae). *Molecular Ecology Notes* **6**: 865-866.

-Ureta, C. y C. Martorell. 2009. Identifying the impacts of chronic anthropogenic disturbance on two threatened cacti to provide guidelines for population-dynamics restoration. *Biological conservation* **142**: 1992-2001.

-Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T., Arias, S. y Ochoterena, H. 2013. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity* **11**: 103-116.

-Velasco Macías, C. G. y M. Nevárez de los Reyes. 2002. Nuevo género de la familia Cactaceae en el Estado de Nuevo León, México: *Digitostigma caput-medusae* Velasco et Nevárez sp. nov. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **4**: 76-86.

-Villaseñor, J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Sociedad Botánica de México **75**: 105-135.

-White Olascoaga, L. 2006. Contribución al conocimiento taxonómico del género *Astrophytum* L. (Cactaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 71 pp.

-Wyka, T.P., Hamerska, M. y M. Wróblewska. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell and Tissue Organ Culture* **87**: 27-32.

-Yeh, C. y B. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* **129**: 157.

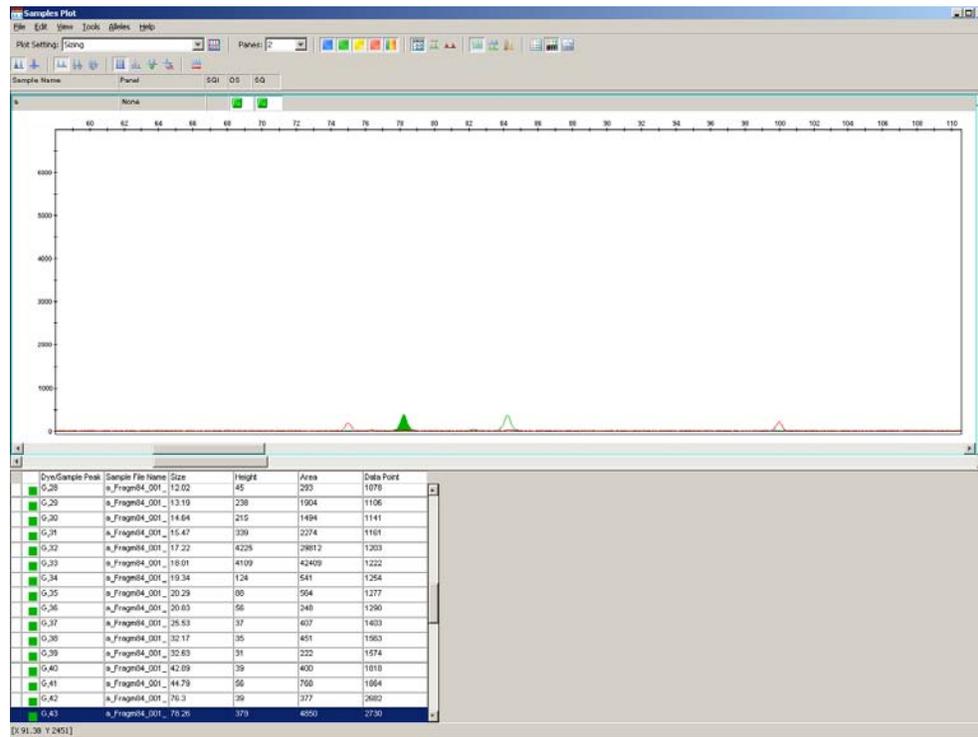
-Zepeda Martínez, V.N. 2010. Ecología de poblaciones y asociación nodriza-protégido de *Astrophytum ornatum* (DC.) F.A.C. WEBER ex BRITTON y ROSE (Cactaceae) en Querétaro, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. pp 60.

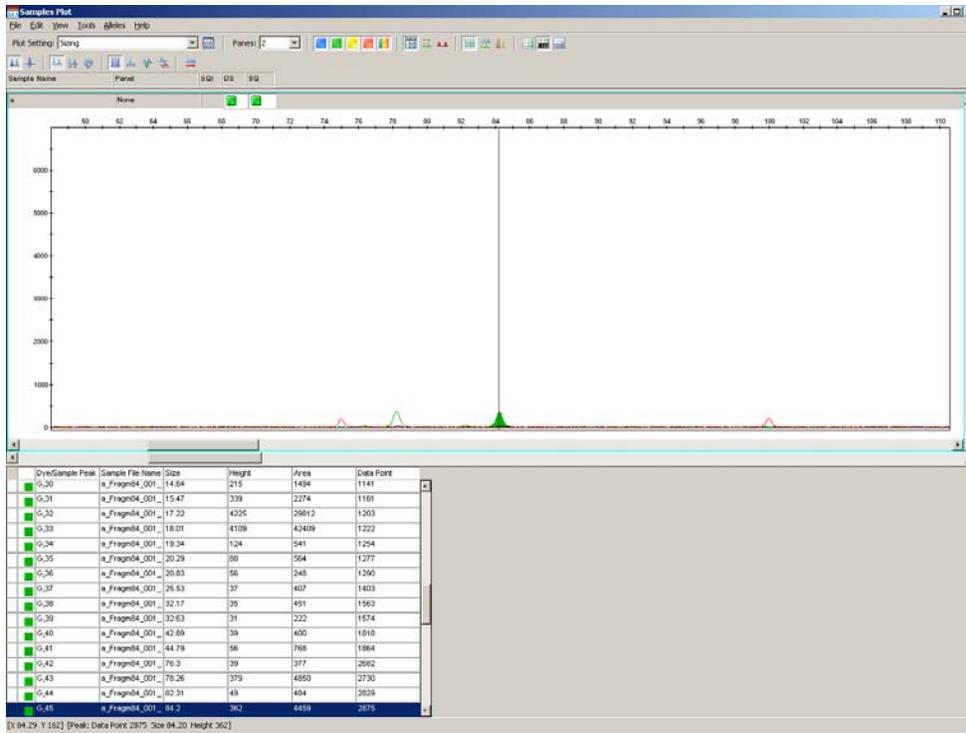
APÉNDICE 1 (Análisis de microsatélites)

Registro de picos de los microsatélites por secuenciación en el Secuenciador ABI 3100 DNA Sequencer® utilizando un size standard GS350ROX como referencia. Los resultados de la secuenciación se visualizaron con el programa GeneMapper® Software (versión 3.7) de Applied Biosystems y con esto se determinó el tamaño final de los alelos y heterocigosidad en las muestras de cada individuo.

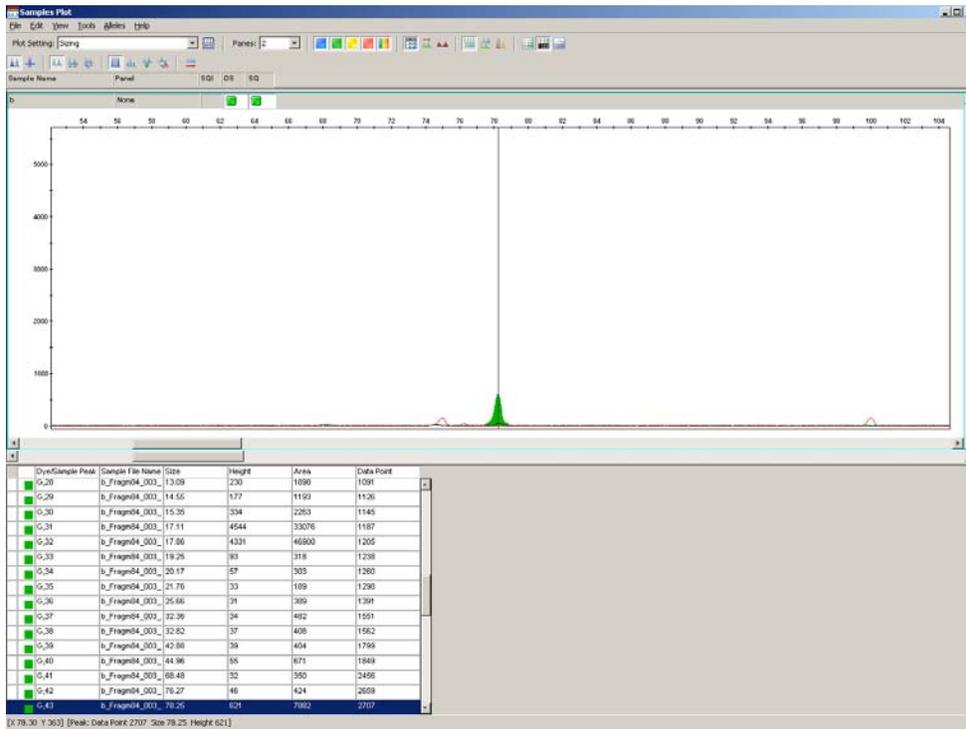
NOTA: Cabe señalar que la “secuenciación” no reporta la secuencia del fragmento sino la longitud del mismo y su posición en la región amplificada, por lo cual, lo que se observa en los diagramas son los picos de las regiones amplificadas dependiendo del tamaño de las mismas y estas pueden estar antes o después de lo reportado previamente.

Extracción 1 (a) locus *AaH11*: heterócigo

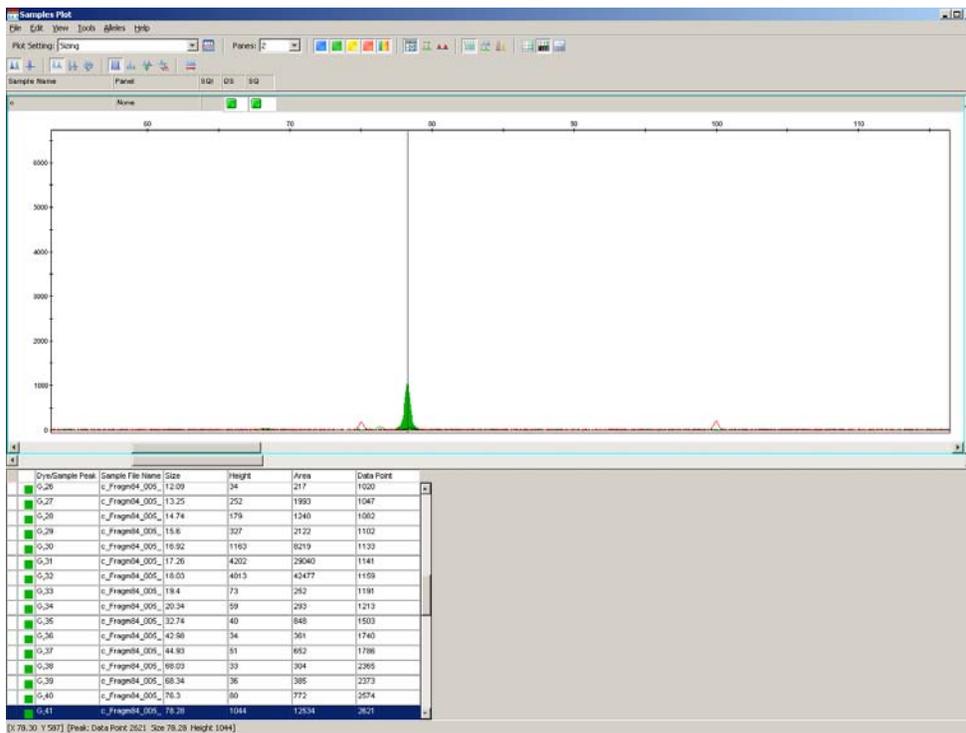




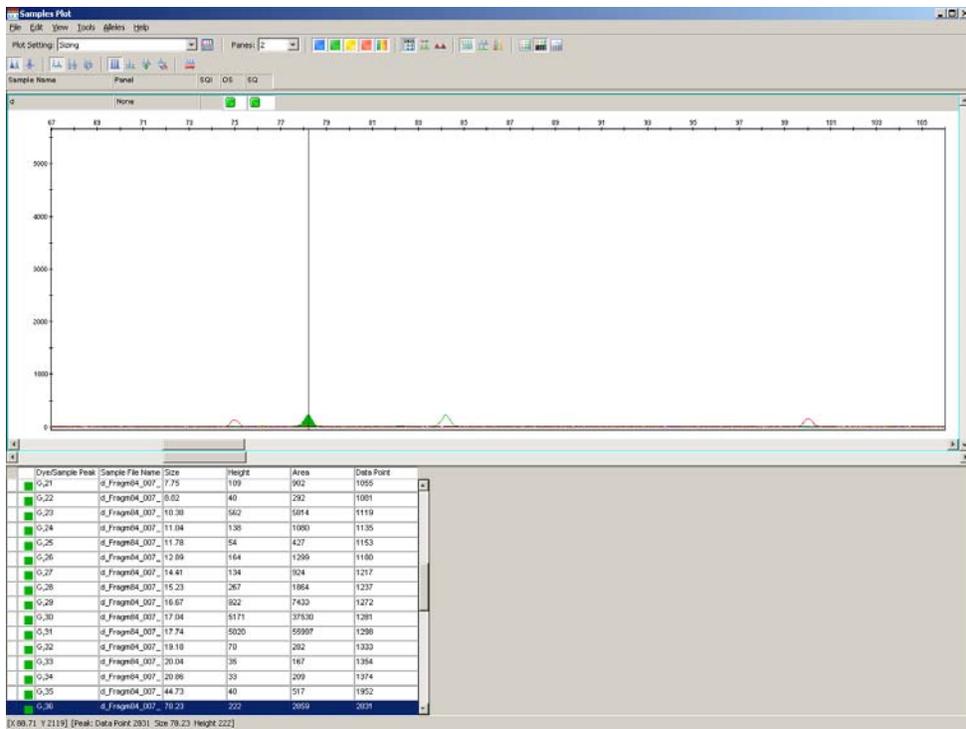
Extracción 2 (b) locus *AaH11* (homócido)

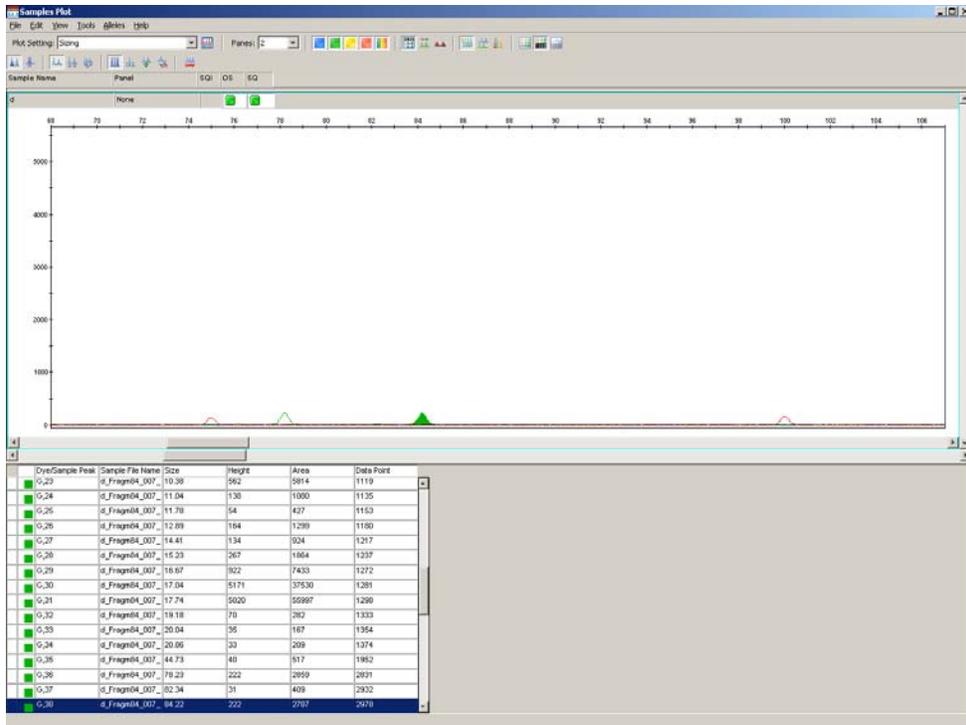


Extracción 3 (c) locus *AaH11*

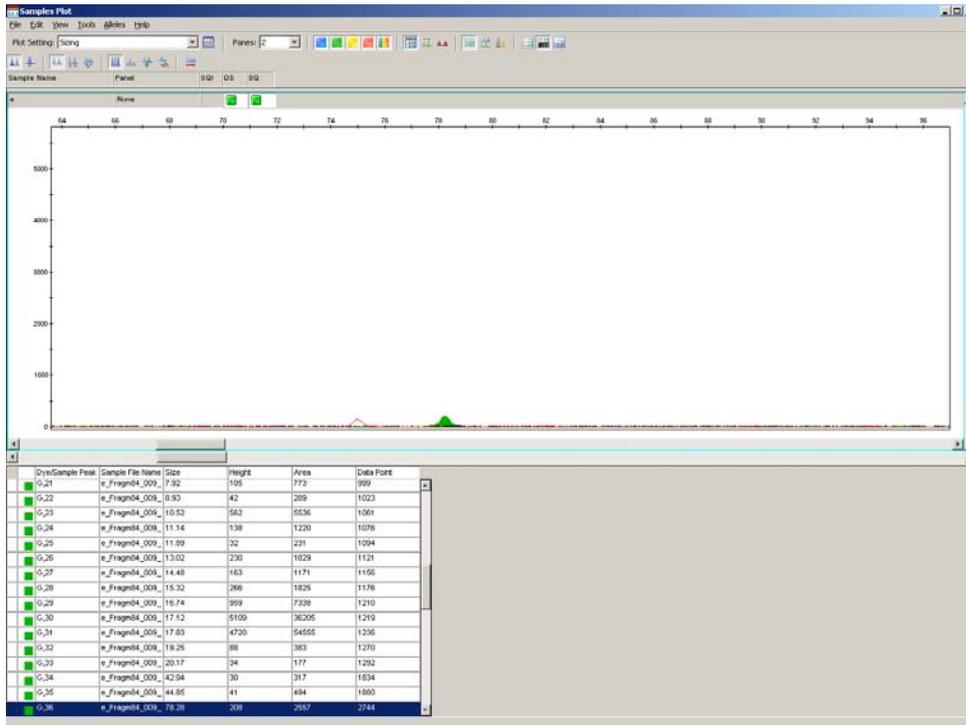


Extracción 4 (d) locus *AaH11* (heterócigo)

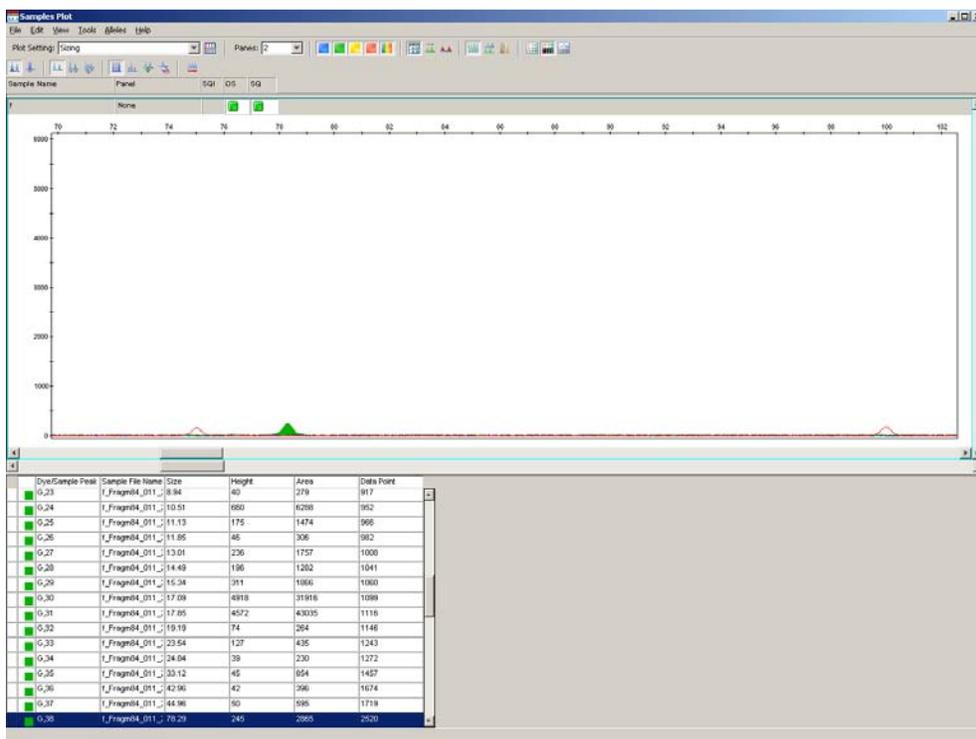




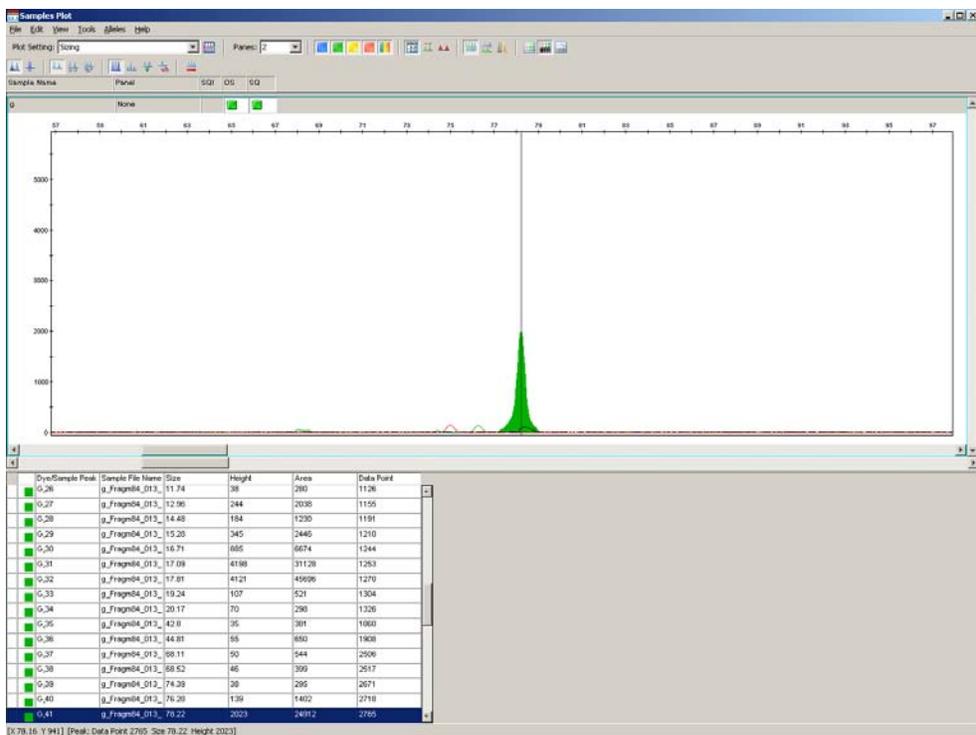
Extracción 5 (e) locus *AaH11* (homócigo)



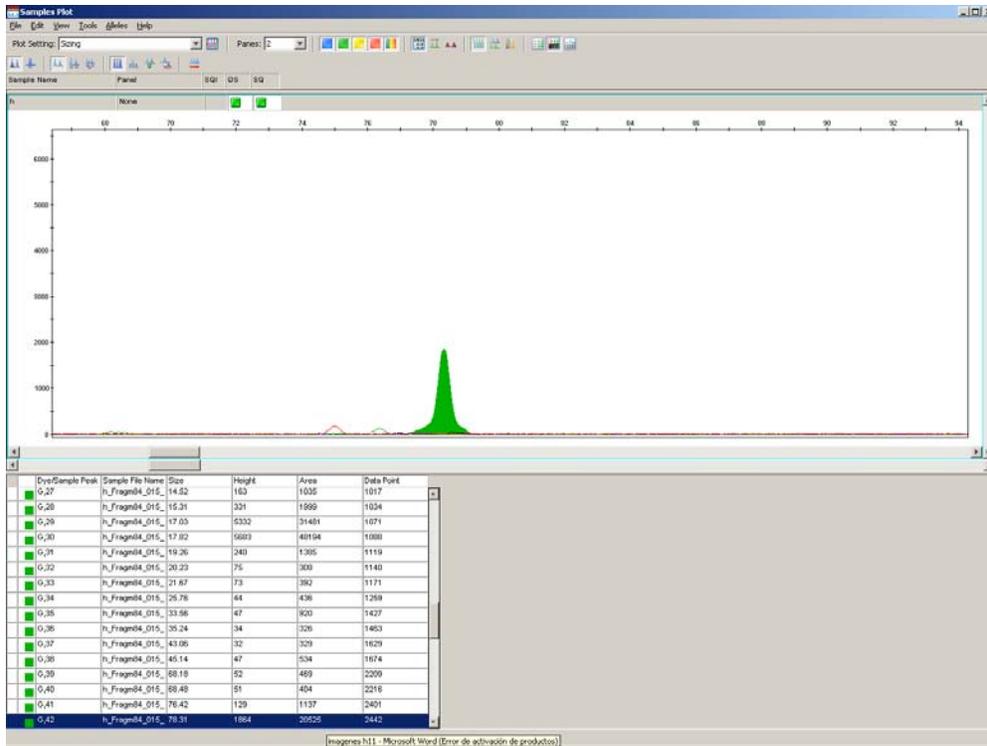
Extracción 6 (f) locus *AaH11* (homócigo)



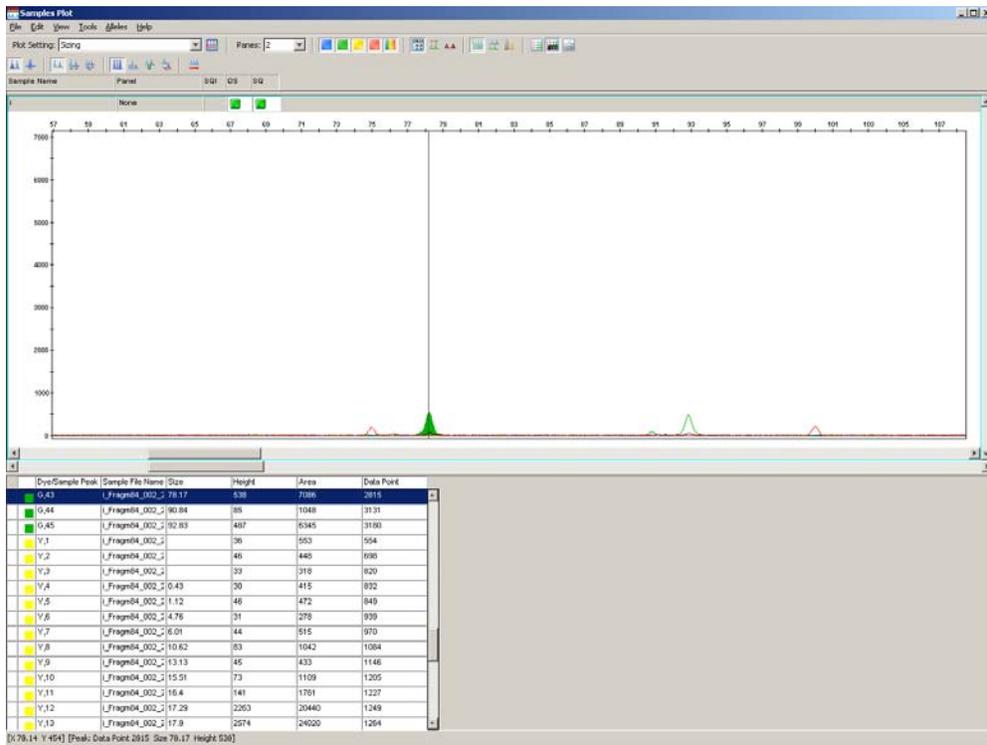
Extracción 7 (g) locus *AaH11* (homócigo)

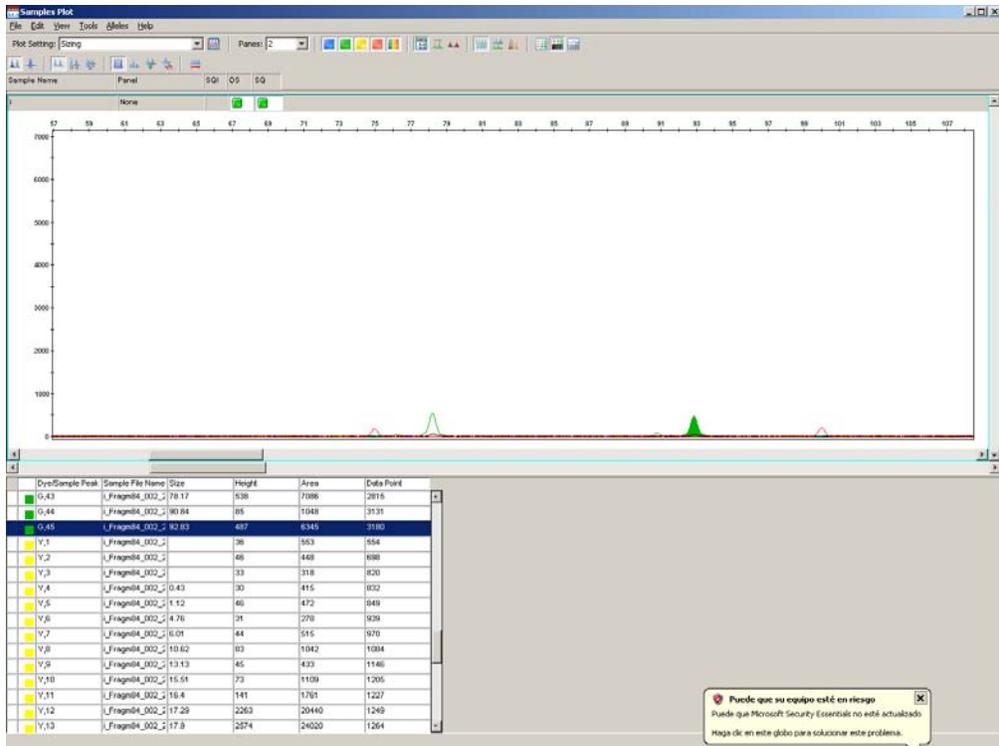


Extracción 8 (h) locus *AaH11* (homócigo)

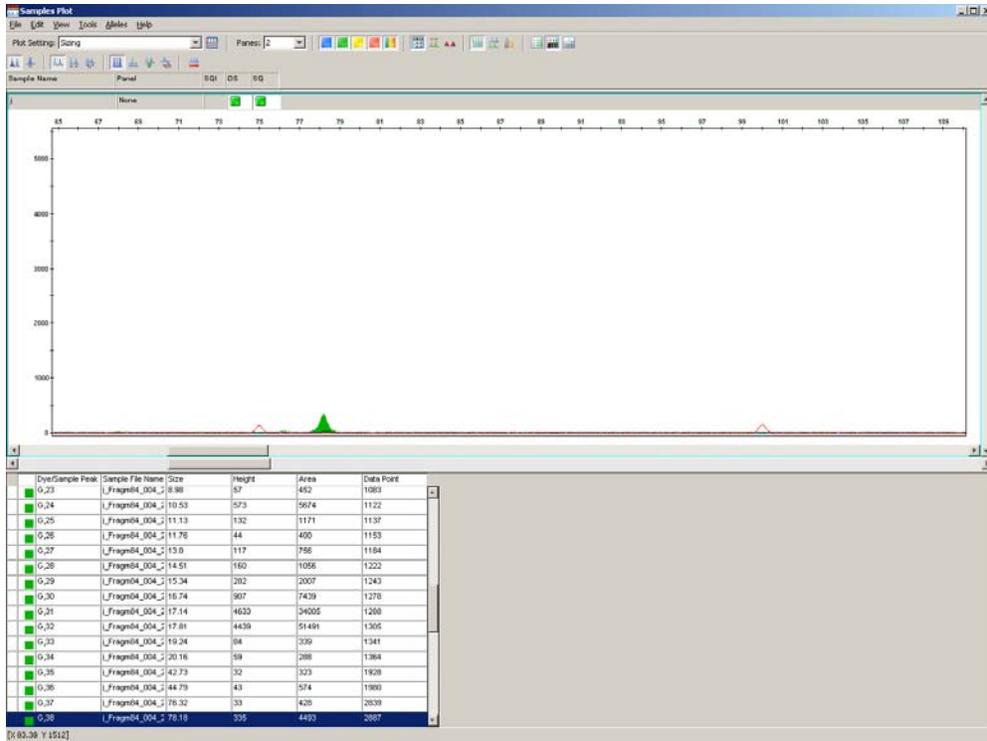


Extracción 9 (i) locus *AaH11* (heterocigo)

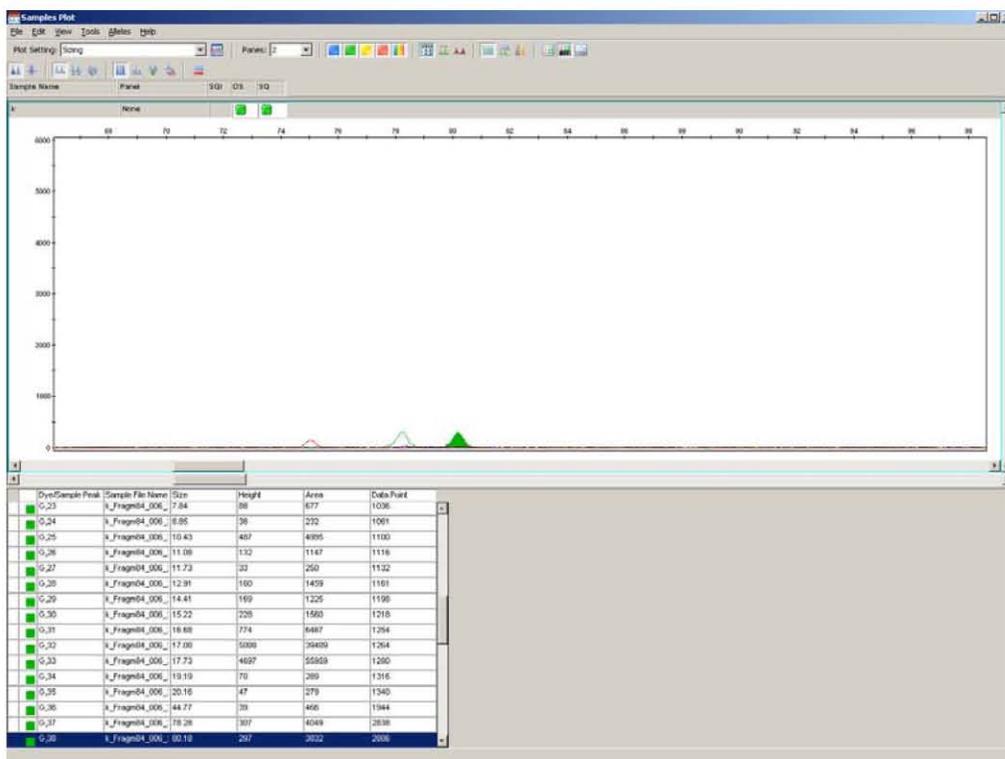
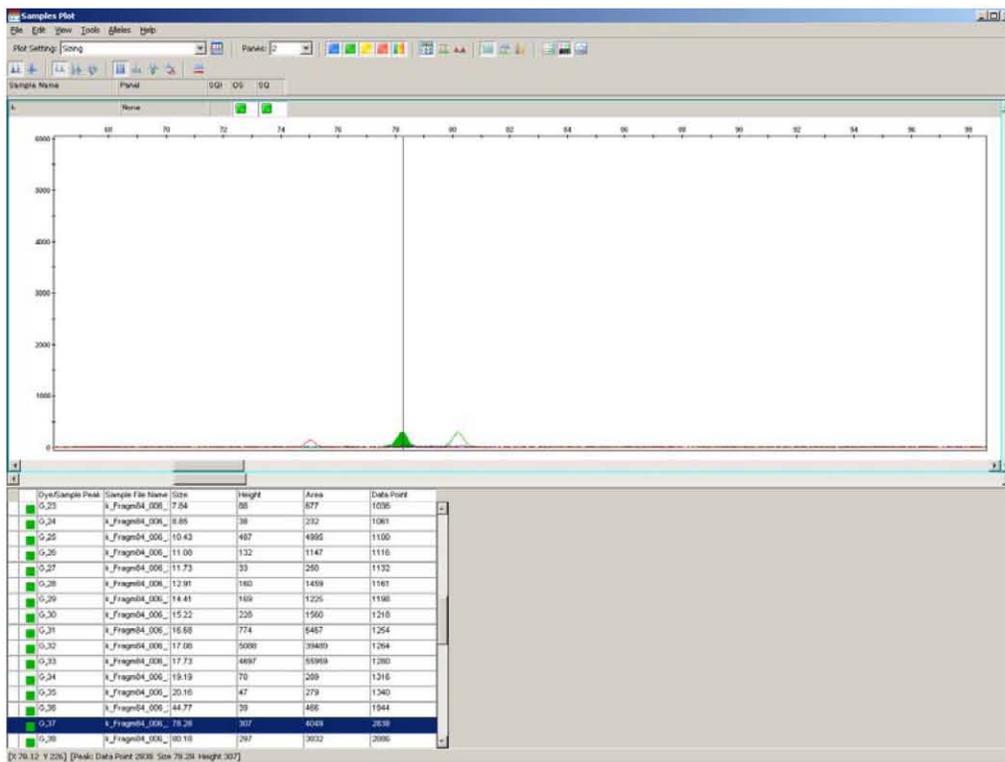




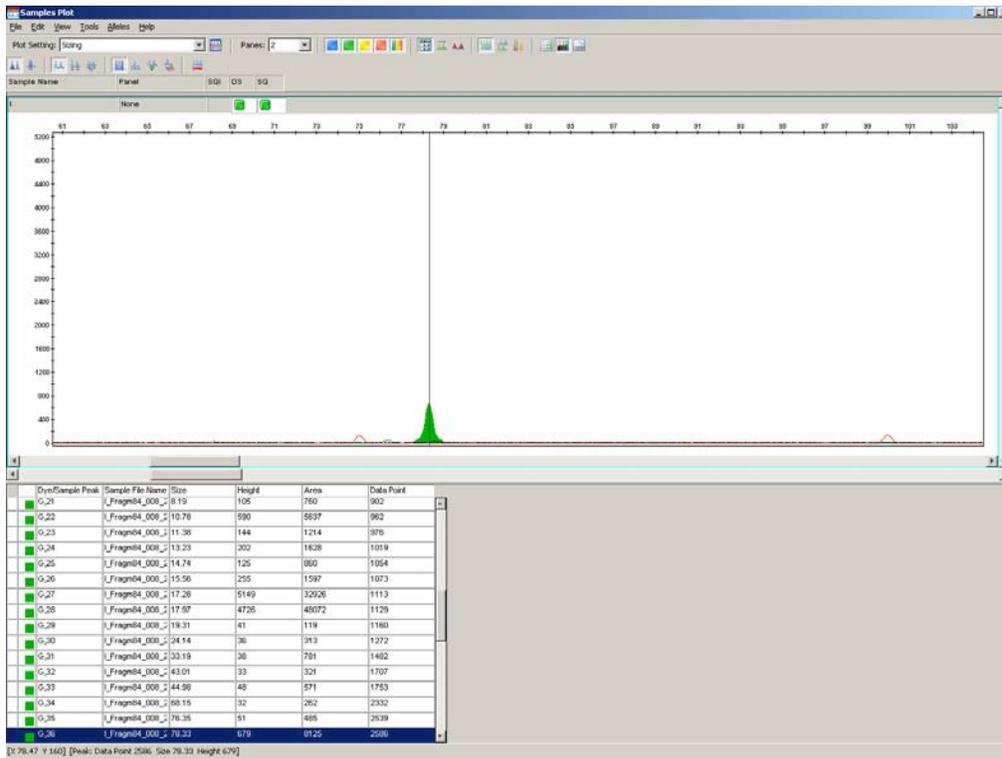
Extracción 10 (j) locus *AaH11* (homócigo)



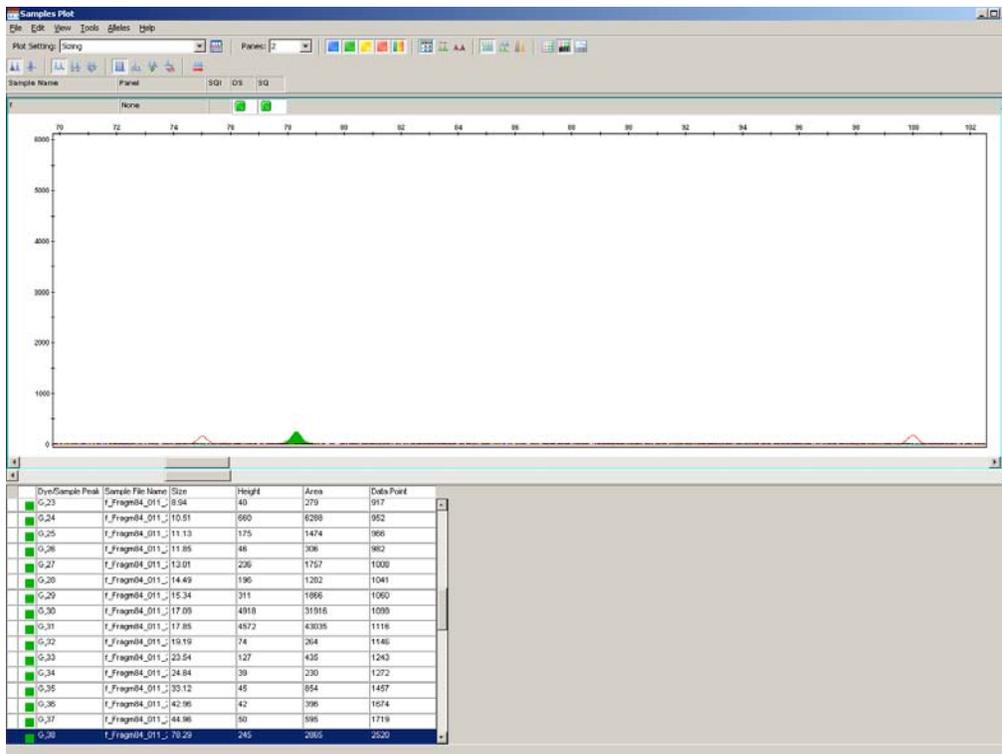
Extracción 11 (k) locus *AaH11* (heterócigo)



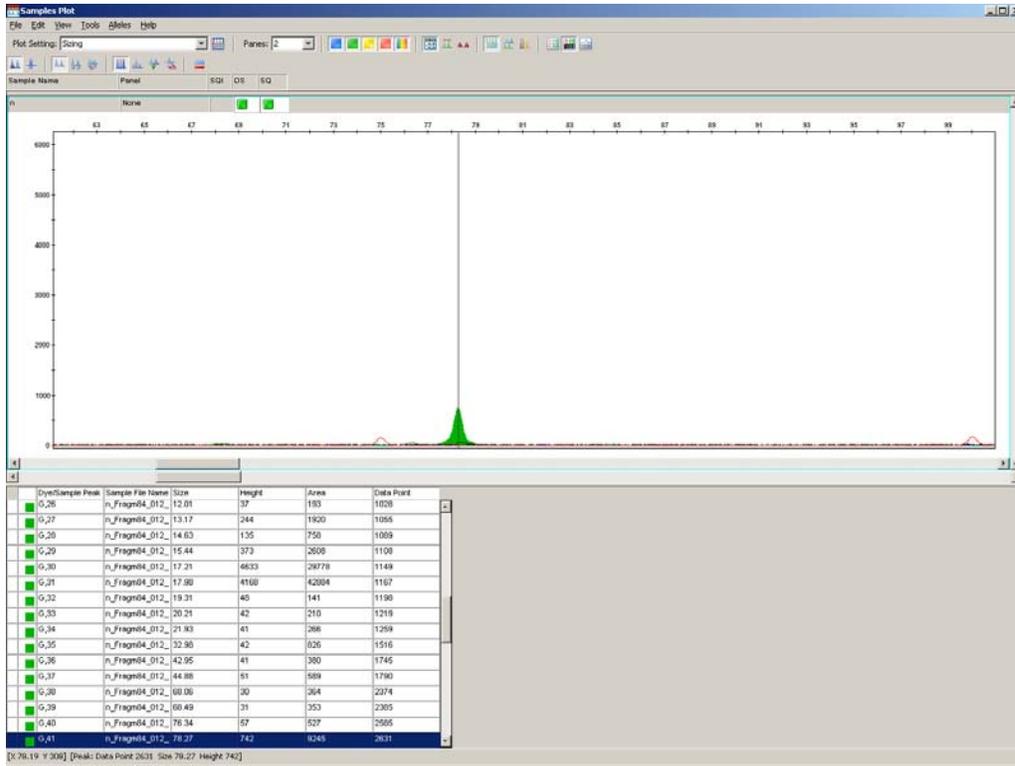
Extracción 12 (l) locus *AaH11* (homócigo)



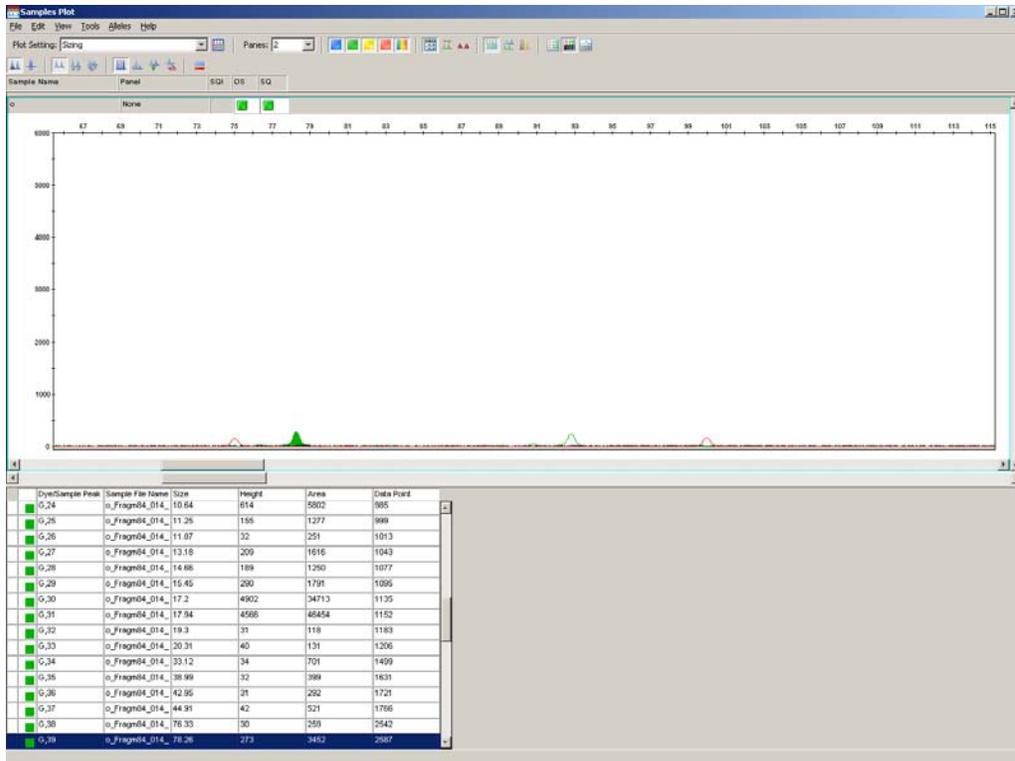
Extracción 13 (m) locus *AaH11* (homócigo)

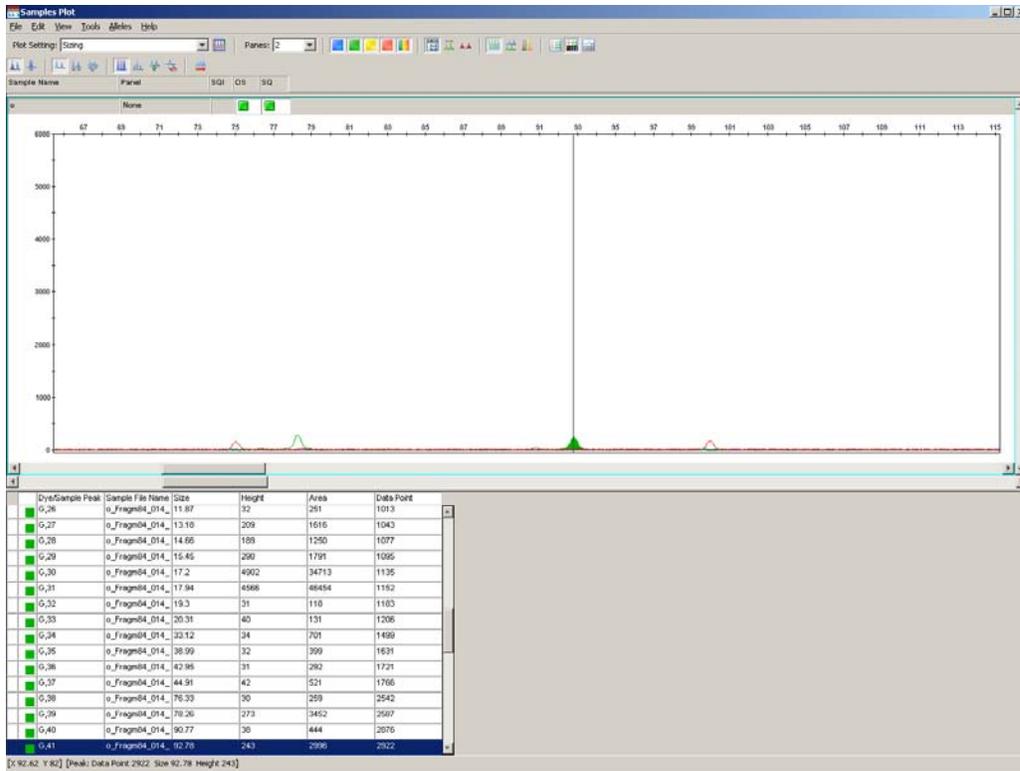


Extracción 14 (n) locus *AaH11* (homócigo)

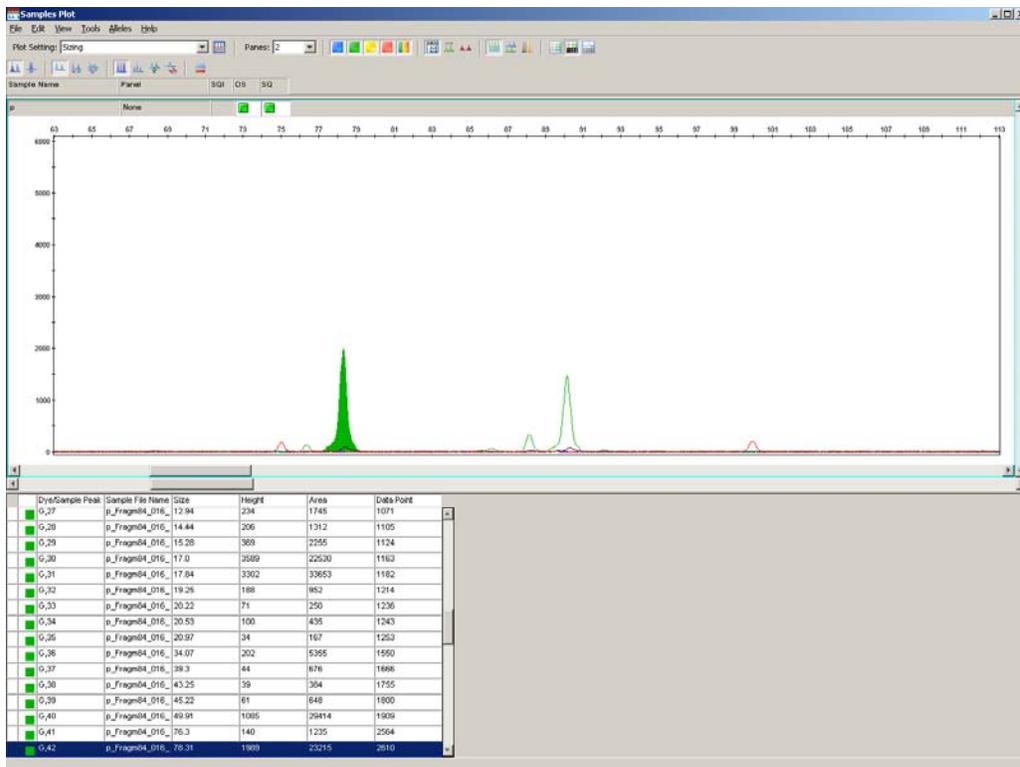


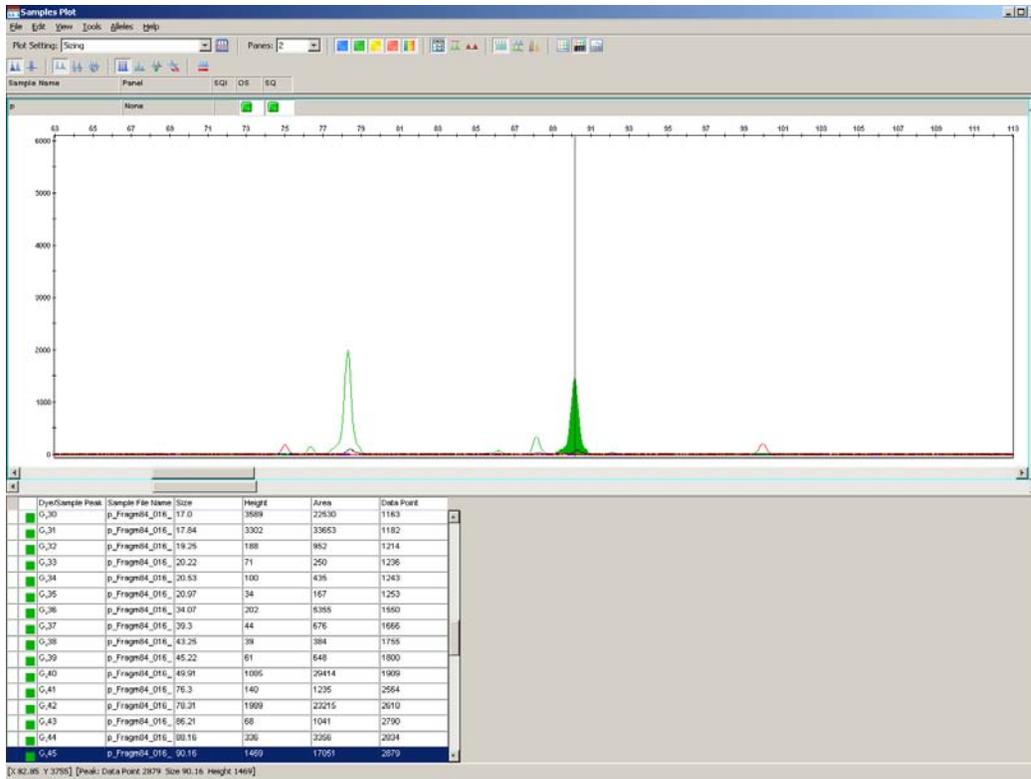
Extracción 15 (o) locus *AaH11* (heterócigo)



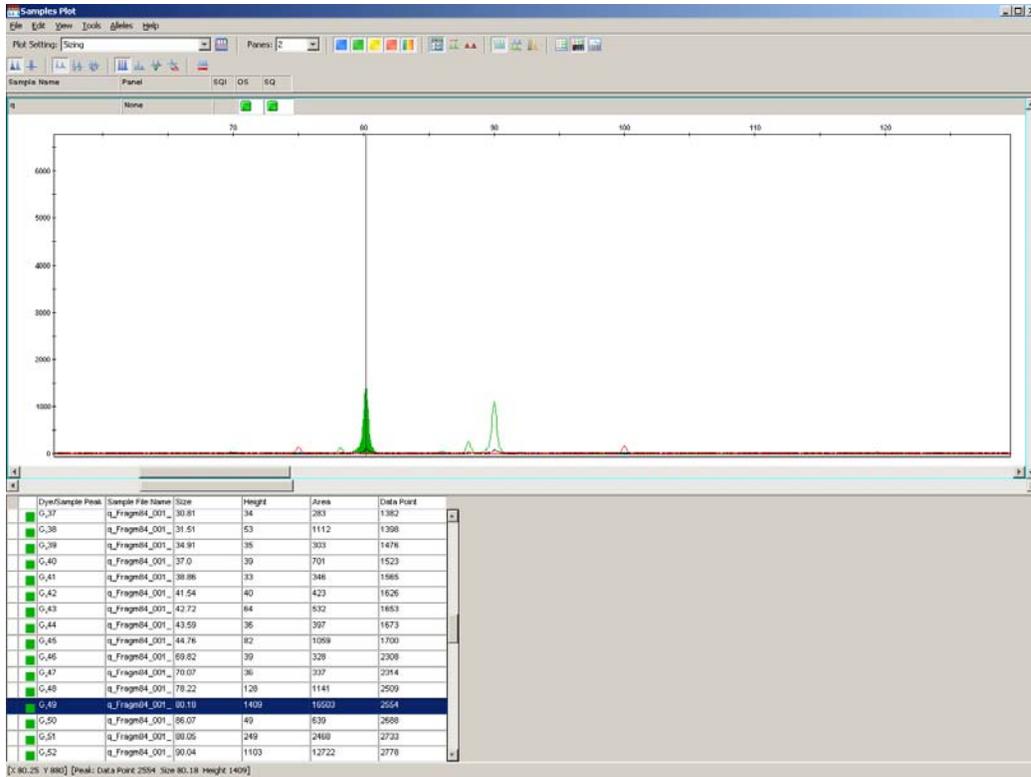


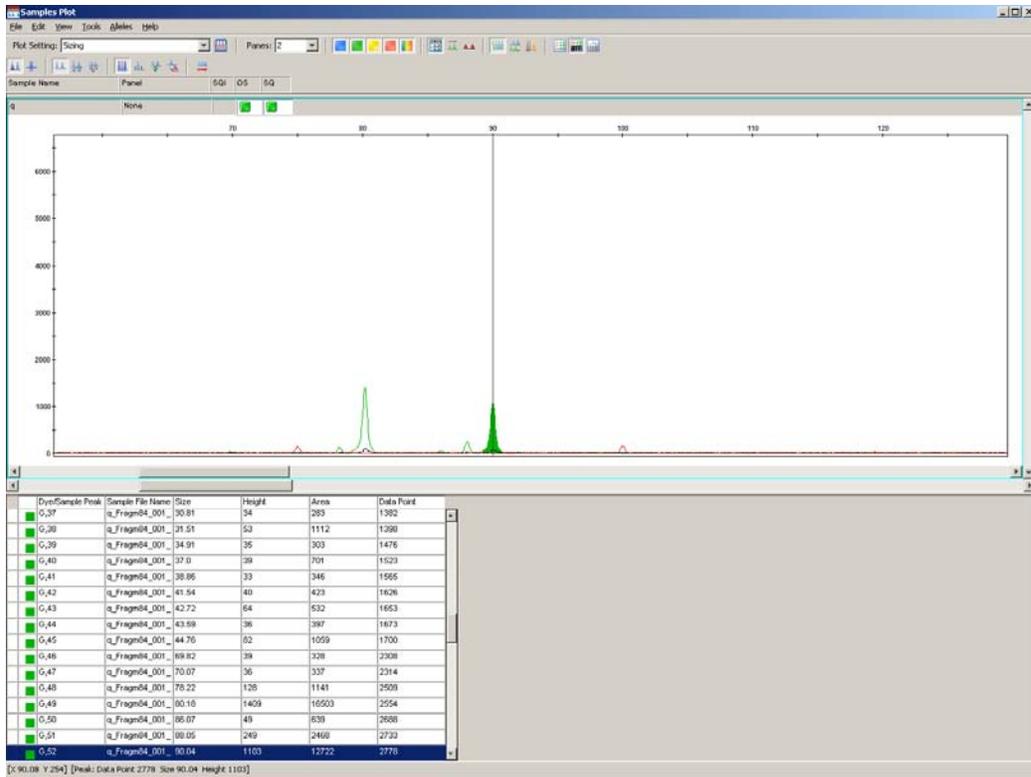
Extracción 16 (p) locus *AaH11* (heterócigo)



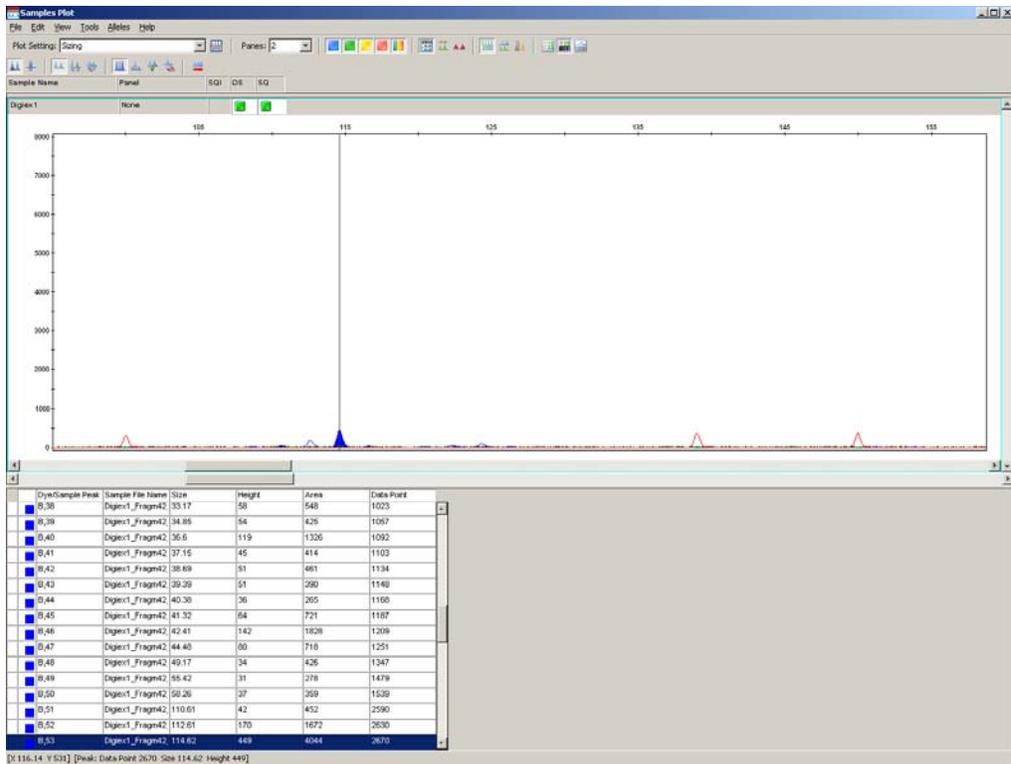


Extracción 17 (q) locus *AaH11* (heterócigo)

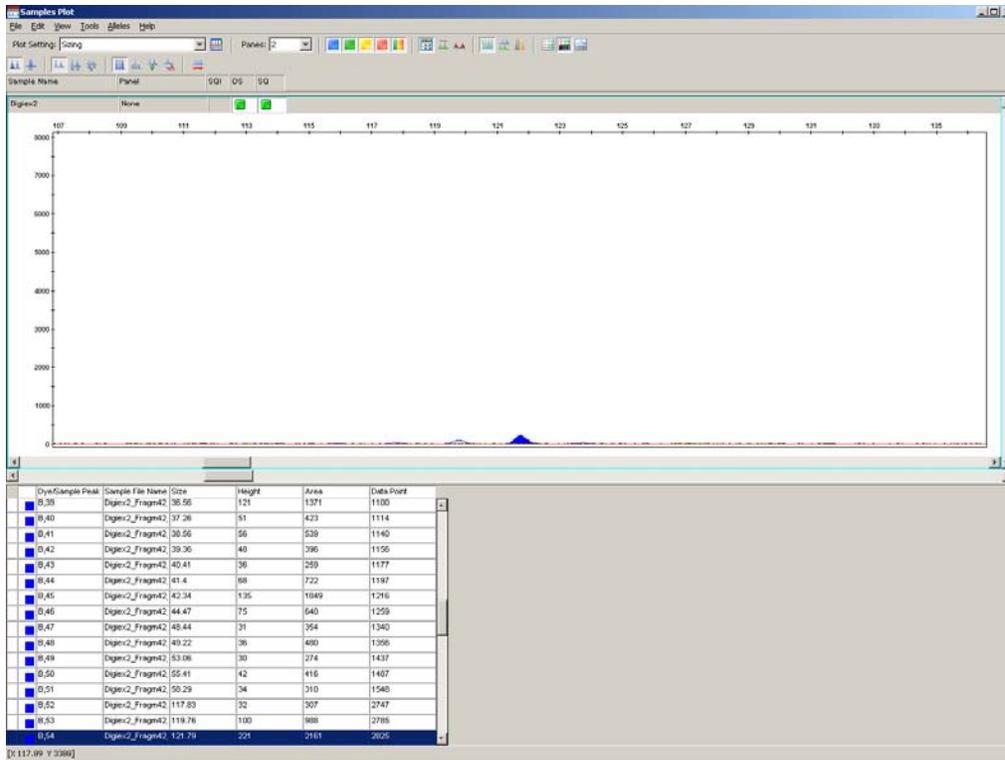




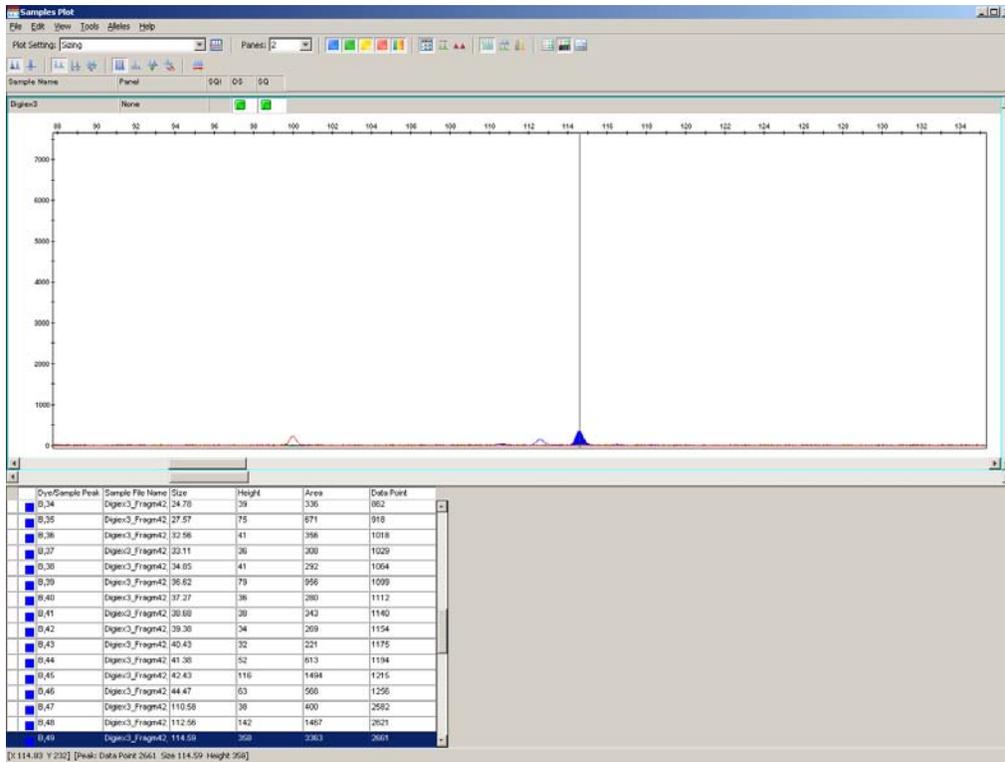
Extracción 1 (a) locus *AaB6* (homocigo)



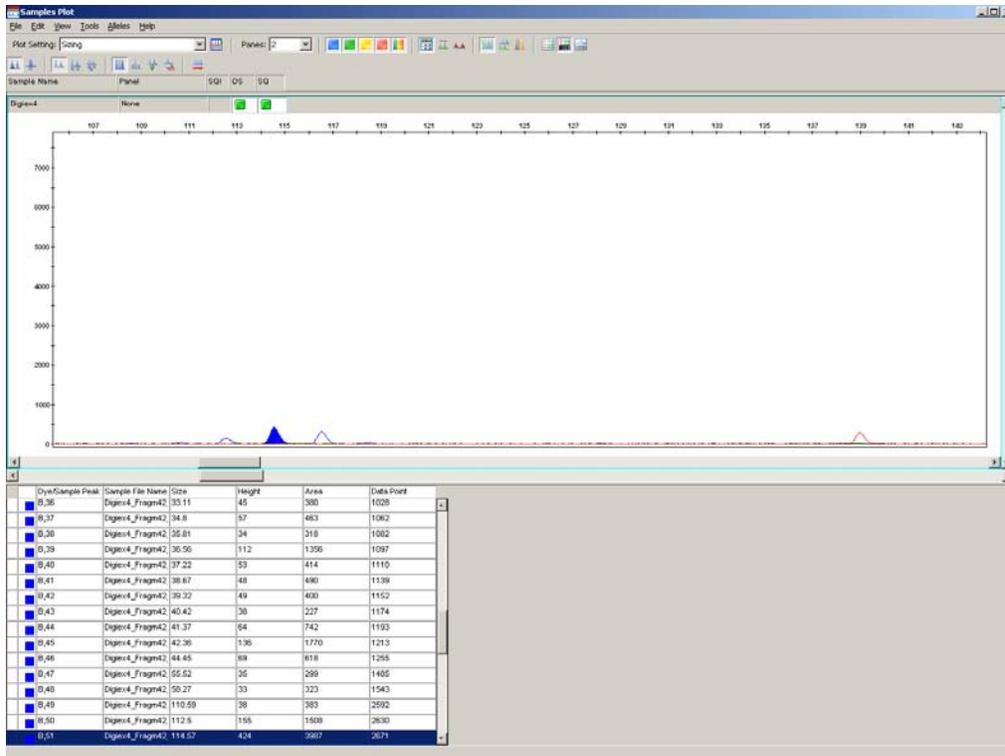
Extracción 2 (b) locus *AaB6* (homocigo)



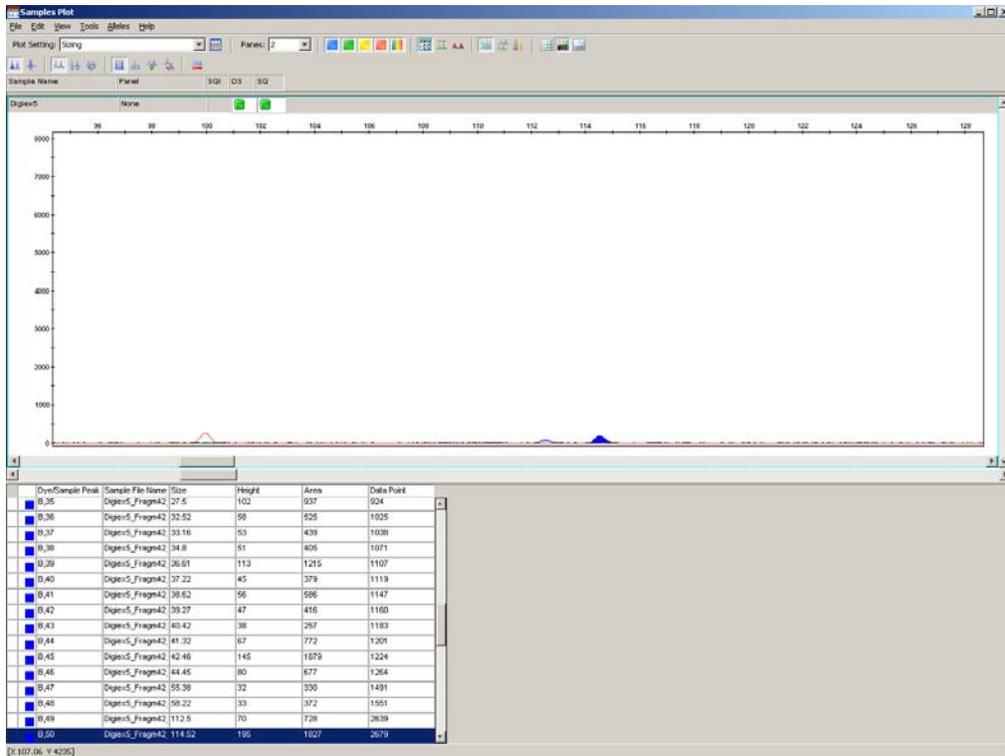
Extracción 3 (c) locus *AaB6* (homócigo)



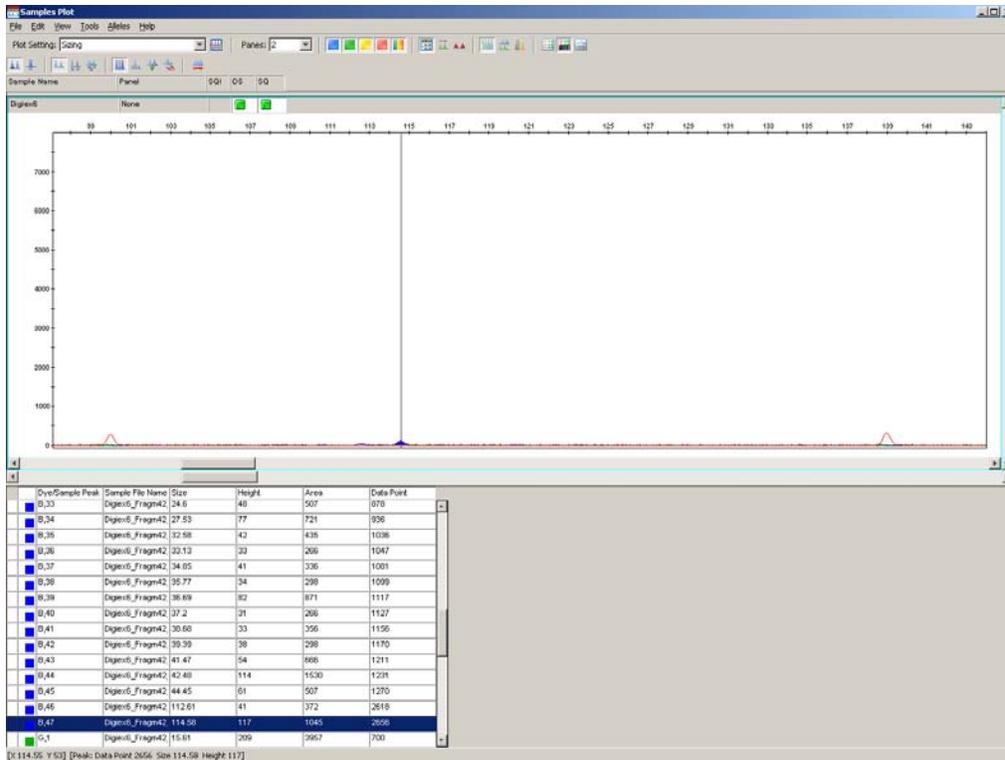
Extracción 4 (d) locus *AaB6* (homócigo)



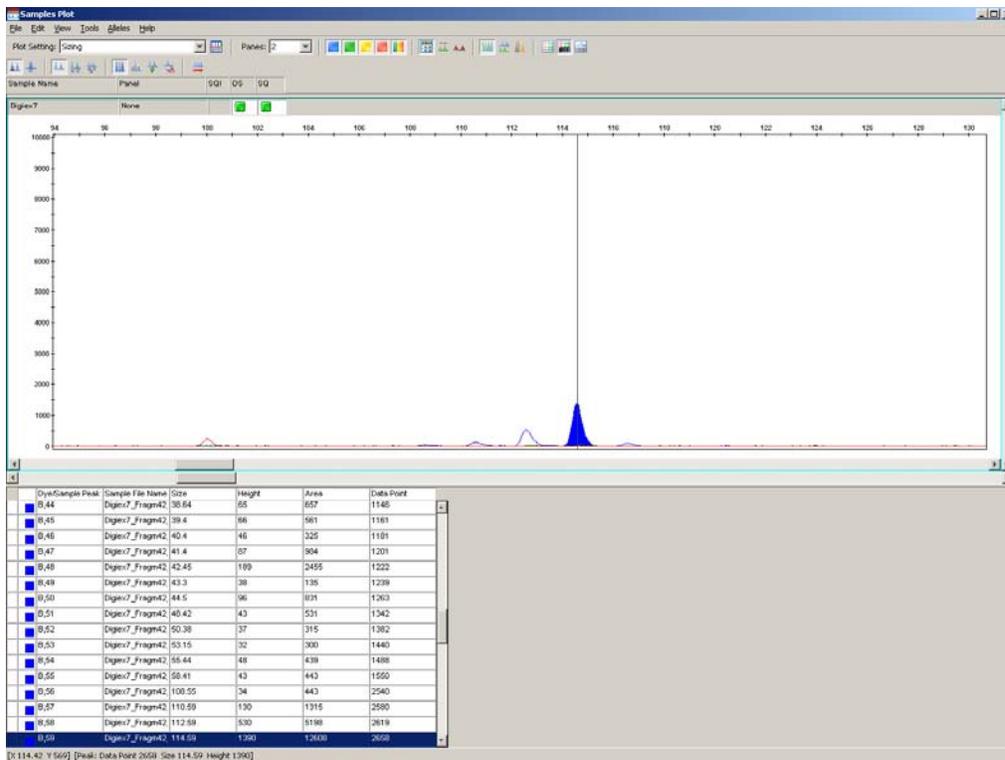
Extracción 5 (e) locus *AaB6* (homócigo)



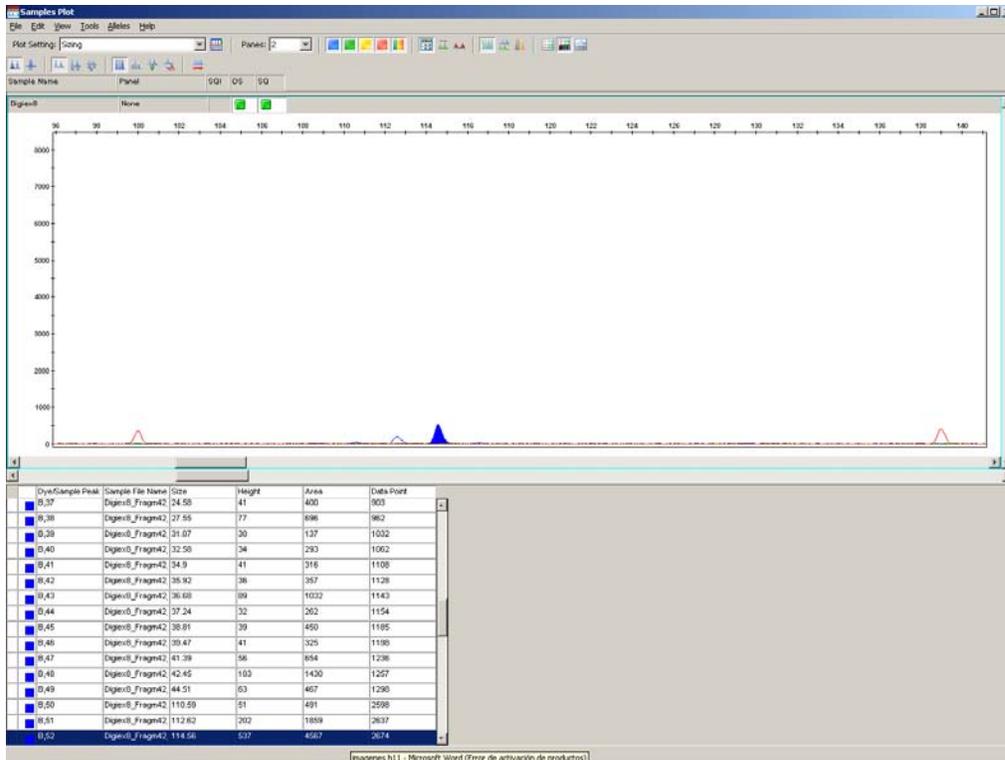
Extracción 6 (f) locus *AaB6* (homócigo)



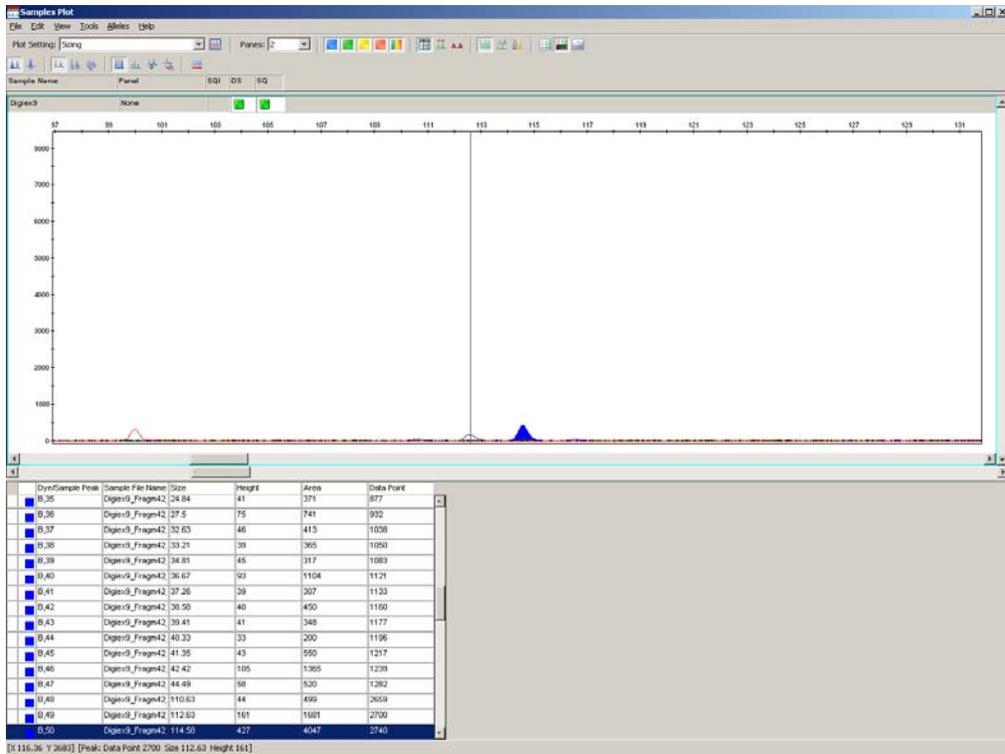
Extracción 7 (g) locus AaB6 (homócigo)



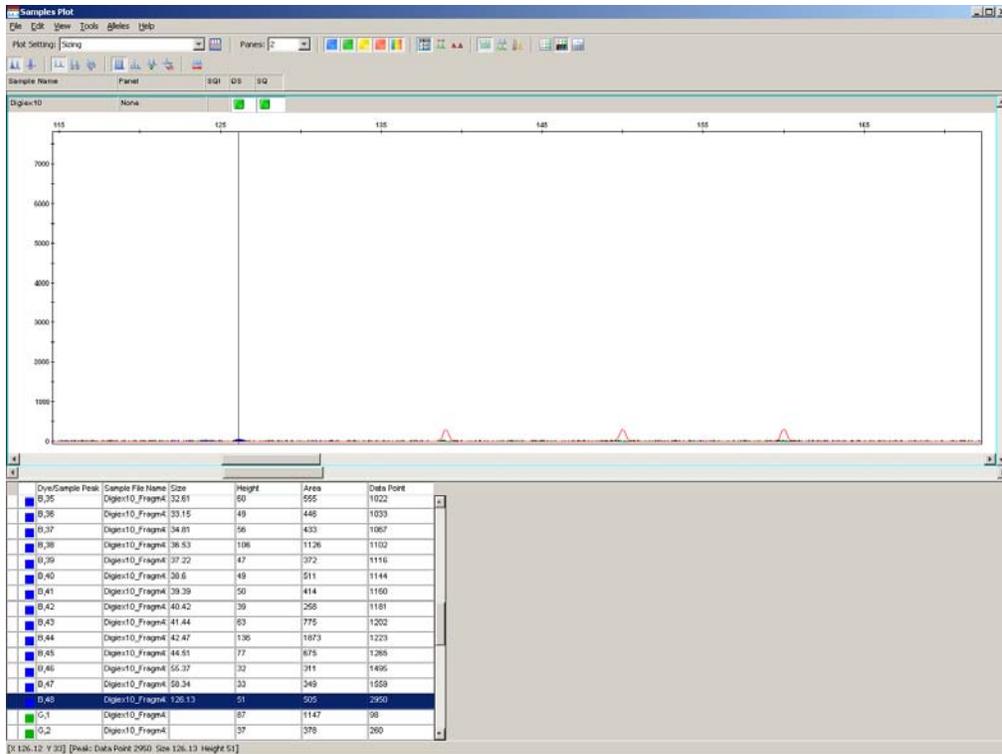
Extracción 8 (h) locus AaB6 (homócigo)



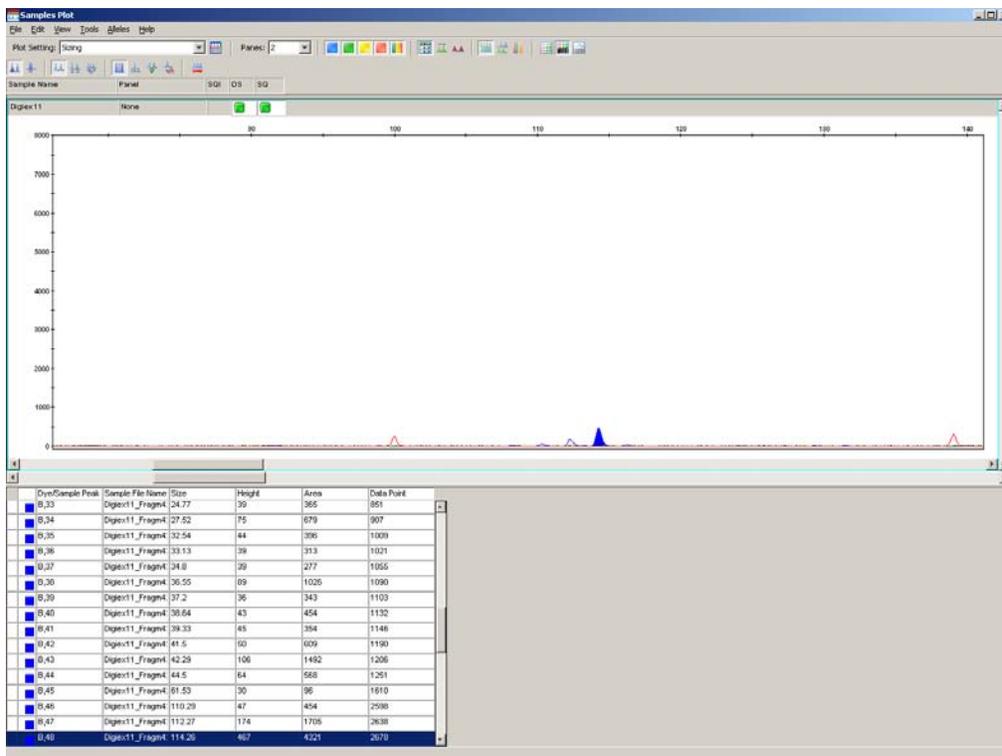
Extracción 9 (i) locus *AaB6* (homócigo)



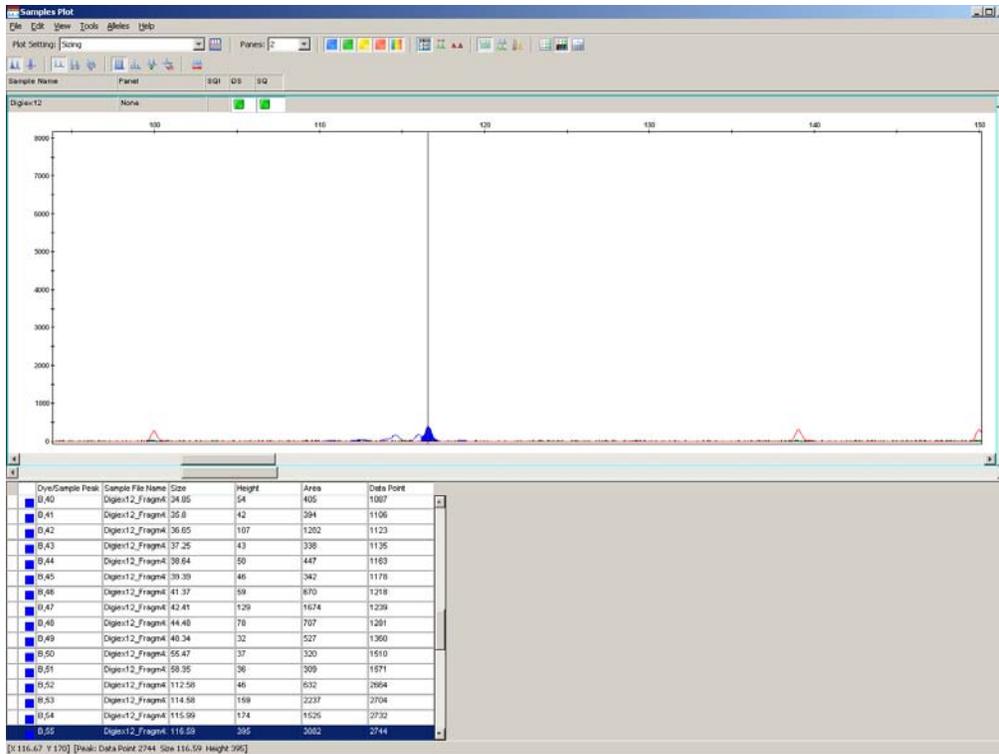
Extracción 10 (j) locus *AaB6* (homócigo)



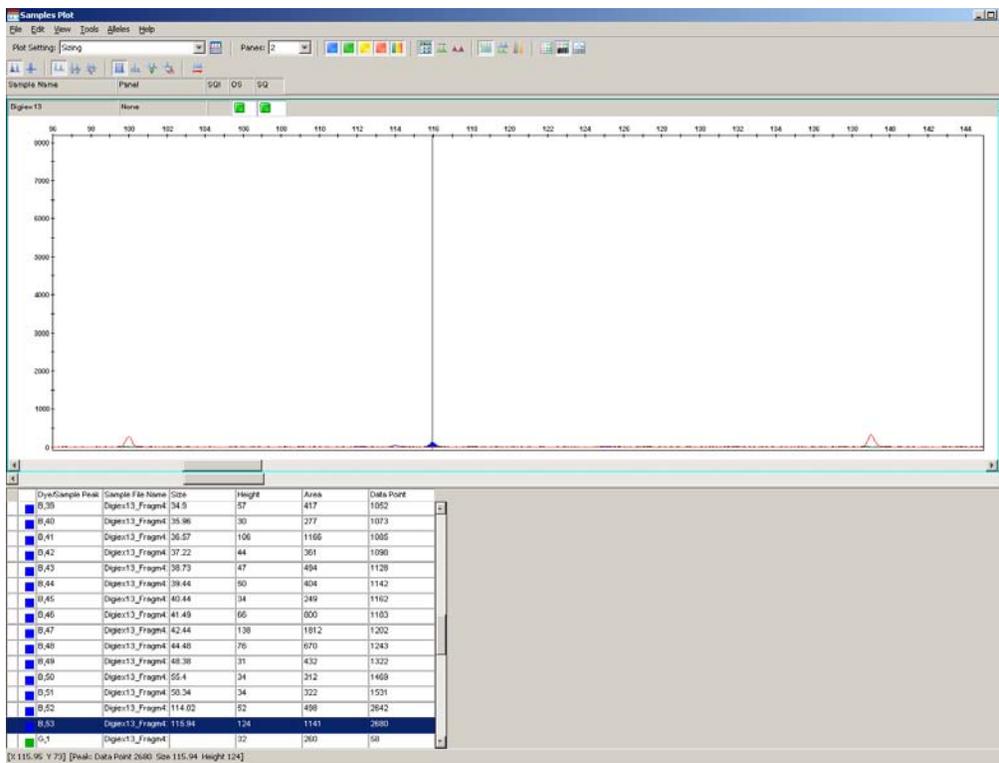
Extracción 11 (k) locus *AaB6* (homócigo)



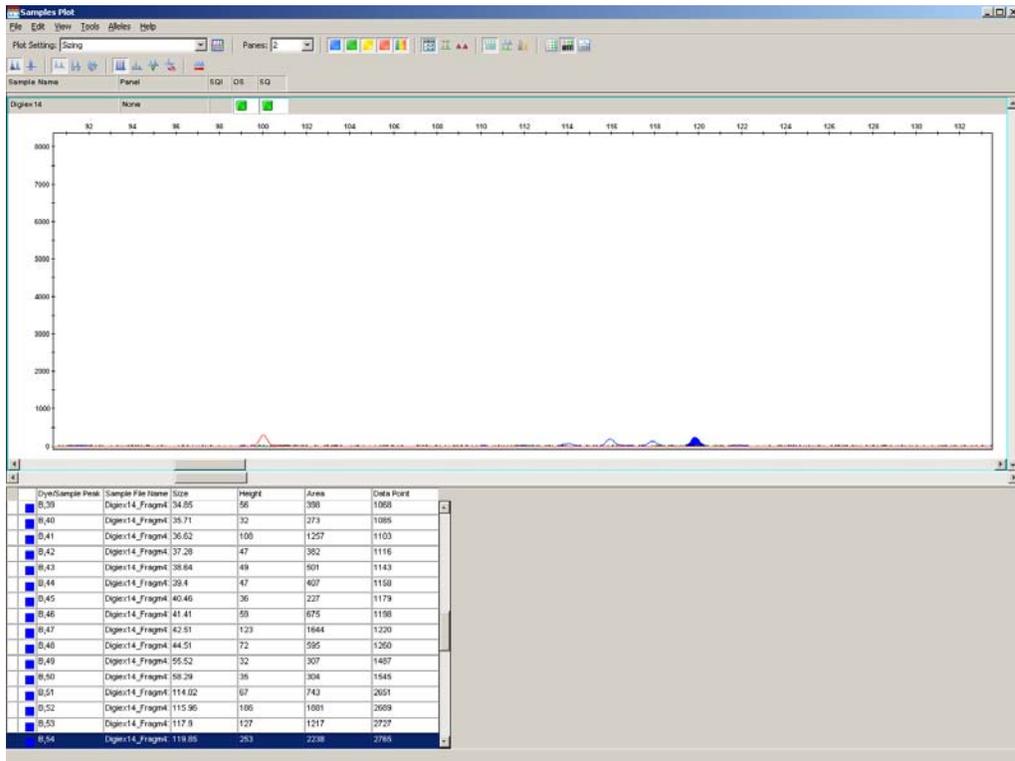
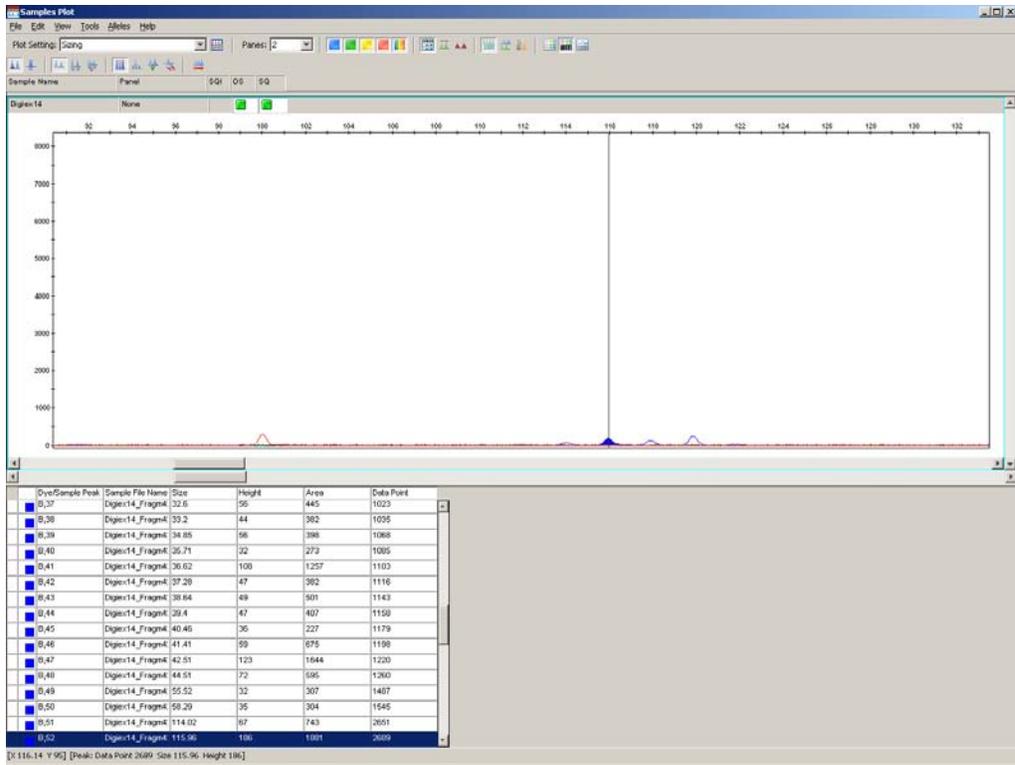
Extracción 12 (l) locus *AaB6* (homócigo)



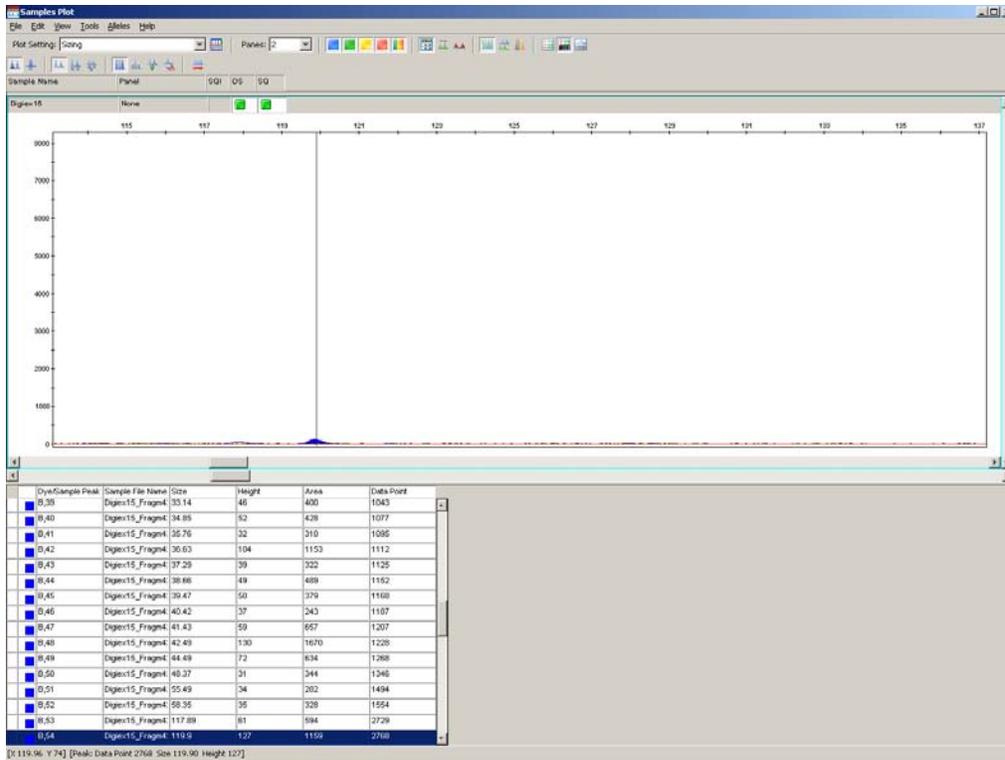
Extracción 13 (m) locus AaB6 (homócigo)



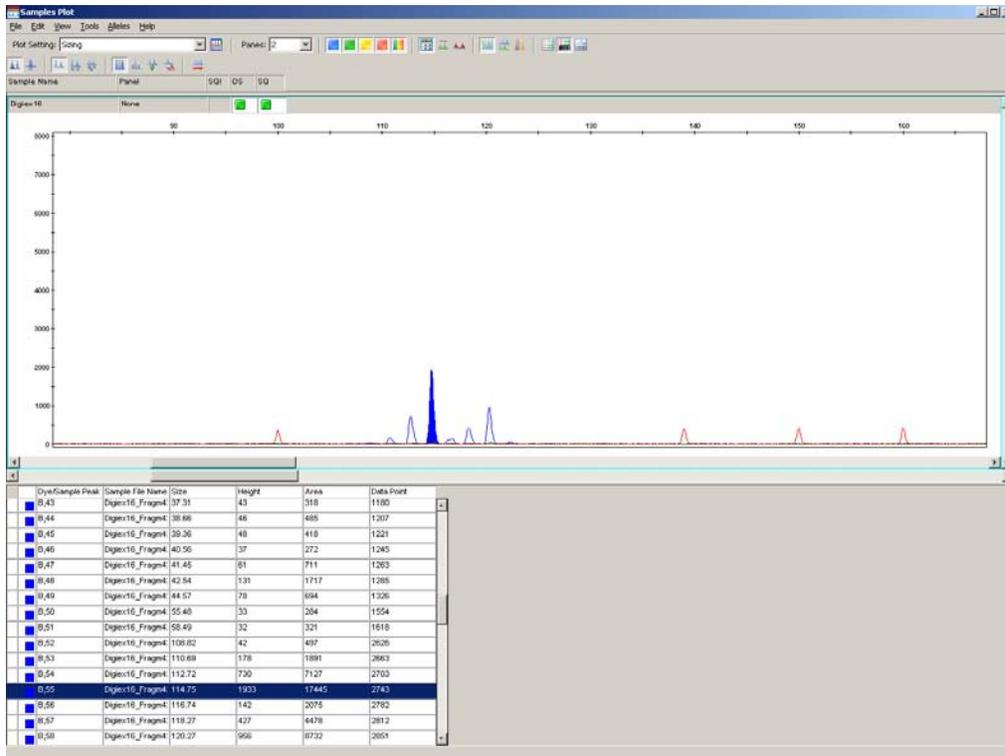
Extracción 14 (n) locus AaB6 (heterócigo)

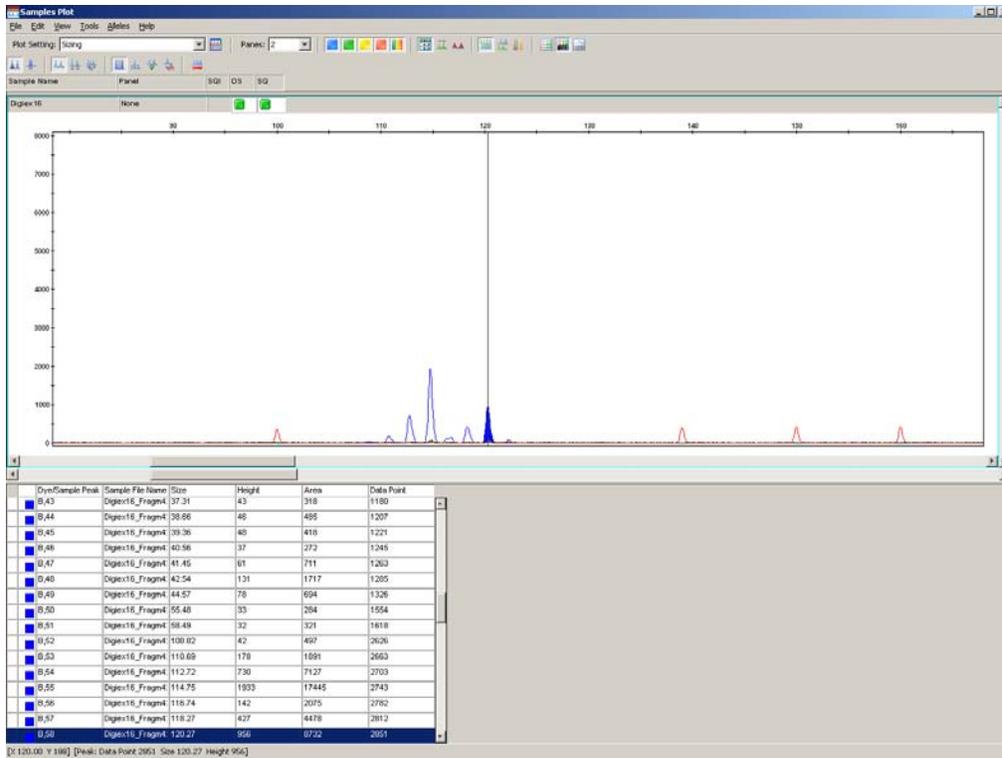


Extracción 15 (o) locus *AaB6* (homócigo)

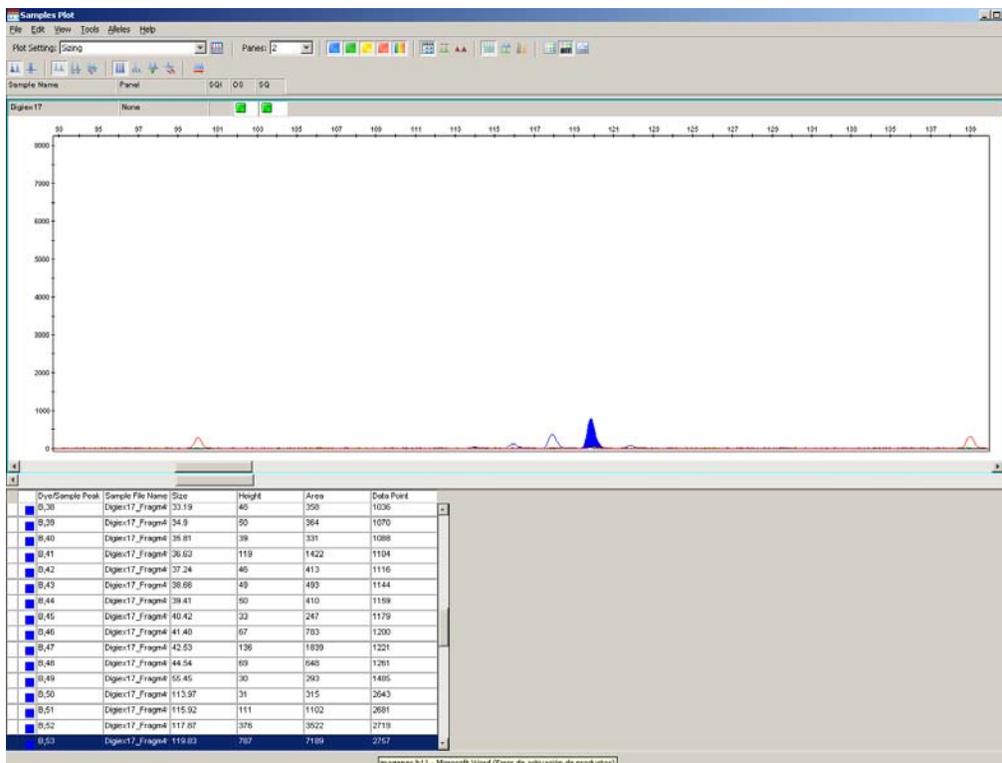


Extracción 16 (p) locus AaB6 (heterócigo)





Extracción 17 (q) locus AaB6 (homócigo)



La forma en que pudieron ser visualizados en GeneMapper fue con las siguientes entradas:

Status	Sample File	Sample No	Comments	Sample Type	SPN	Analysis Method	Panel	Size Standard	Matrix	Run Name	Instrument Type	Run Date & Time	REF	SCL	S/NF
1	u_Fragm4_001_2011-1	a	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34			
2	s_Fragm4_001_2011-1	b	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
3	u_Fragm4_002_2011-1	a	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
4	l_Fragm4_002_2011-1	b	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
5	c_Fragm4_002_2011-1	c	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
6	e_Fragm4_002_2011-1	e	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
7	n_Fragm4_012_2011-1	a	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
8	g_Fragm4_013_2011-1	g	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
9	d_Fragm4_007_2011-1	d	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
10	l_Fragm4_004_2011-1	l	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
11	u_Fragm4_006_2011-1	u	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
12	o_Fragm4_014_2011-1	o	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
13	l_Fragm4_005_2011-1	l	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
14	t_Fragm4_011_2011-1	t	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
15	m_Fragm4_010_2011-1	m	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
16	h_Fragm4_015_2011-1	h	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
17	g_Fragm4_016_2011-1	g	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24			
18	a-2_Fragm4_003_2011	a-2	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34			
19	e-2_Fragm4_005_2011	e-2	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34			
20	n-2_Fragm4_007_2011	n-2	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	None	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34			
21	Digen10_Fragm4_2_004	Digen10	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
22	Digen11_Fragm4_2_006	Digen11	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
23	Digen12_Fragm4_2_008	Digen12	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
24	Digen13_Fragm4_2_010	Digen13	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
25	Digen14_Fragm4_2_012	Digen14	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
26	Digen15_Fragm4_2_014	Digen15	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
27	Digen16_Fragm4_2_016	Digen16	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
28	Digen17_Fragm4_2_018	Digen17	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 01:09:31				
29	Digen1_Fragm4_2_001_2	Digen1	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
30	Digen2_Fragm4_2_002_2	Digen2	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
31	Digen3_Fragm4_2_003_2	Digen3	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
32	Digen4_Fragm4_2_004_2	Digen4	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
33	Digen5_Fragm4_2_005_2	Digen5	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
34	Digen6_Fragm4_2_011_2	Digen6	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
35	Digen7_Fragm4_2_013_2	Digen7	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
36	Digen8_Fragm4_2_015_2	Digen8	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				
37	Digen9_Fragm4_2_017_2	Digen9	None	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34				

Sample Type	SPN	Analysis Method	Panel	Size Standard	Matrix	Run Name	Instrument Type	Run Date & Time	REF	SCL	S/NF	M/F	C/G	D/G	LD1	LD2	LD3	Lane	Well
1	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34										1	A09
2	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										1	A07
3	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										3	B07
4	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										2	A08
5	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										5	C07
6	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										9	H07
7	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										13	F00
8	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										13	G07
9	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										7	D07
10	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										4	B06
11	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										6	C00
12	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										14	G08
13	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										8	D08
14	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										11	F07
15	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										10	B08
16	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										15	H07
17	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 09:41:24										16	H08
18	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34										3	B09
19	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34										5	C09
20	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	H11 DGI	AB3100	2011-11-25 11:25:34										7	D09
21	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										4	B02
22	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										8	C02
23	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										8	D02
24	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										10	E02
25	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										12	F02
26	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										14	G02
27	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										16	H02
28	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 01:09:31										14	G12
29	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										1	A01
30	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										3	B01
31	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										5	C01
32	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										7	D01
33	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										9	E01
34	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										11	F01
35	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										13	G01
36	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										15	H01
37	Sample	NA	Microsatellite Default	None	GS350PROX	secuencias BE mguiar	AB3100	2011-06-30 02:44:34										2	A02

Con la información de las visualizaciones en GeneMapper se construyó el siguiente cuadro:

Loci: 2 Muestras: 17 Poblaciones: 1 Individuos: 17

Digitostigma			Localidad: bajo torres cfe		
		b6		h11	
1	bajo torres cfe	115	115	78	84
2	bajo torres cfe	122	122	78	78
3	bajo torres cfe	115	115	78	78
4	bajo torres cfe	115	115	78	84
5	bajo torres cfe	114	114	78	78
6	bajo torres cfe	114	114	78	78
7	bajo torres cfe	115	115	78	78
8	bajo torres cfe	115	115	78	78
9	bajo torres cfe	115	115	78	93
10	bajo torres cfe	125	125	78	78
11	bajo torres cfe	114	114	78	80
12	bajo torres cfe	117	117	78	78
13	bajo torres cfe	115	115	78	78
14	bajo torres cfe	116	120	78	78
15	bajo torres cfe	119	119	78	93
16	bajo torres cfe	115	121	78	90
17	bajo torres cfe	120	120	80	90

En los software GenAIEx Ver. 6.41 y Arlequin ver. 3.51.2 se obtuvieron los siguientes resultados:

No. Samples	17				
No. Pops.	1				
Allele Frequencies and Sample Size by Populations					
Locus	Allele/n	bajo torres cfe			
b6	N	17			
	114	0.176			0.176
	115	0.441			0.441
	116	0.029			0.029
	117	0.059			0.059
	119	0.059			0.059
	120	0.088			0.088
	121	0.029			0.029
	122	0.059			0.059
	125	0.059			0.059
h11	N	17			1.000
	78	0.765			0.765
	80	0.059			0.059
	84	0.059			0.059

	90	0.059			0.059
	93	0.059			0.059
					1.000

Allele Frequencies by Locus for Codominant Data			
Data Sheet	Final		
Data Title	Digitostigma		
No. Loci	2		
No. Samples	17		
No. Pops.	1		
Allele Frequencies and Sample Size by Locus			
Pop	Allele/n	b6	h11
bajo torres cfe	N	17	17
	78		0.765
	80		0.059
	84		0.059
	90		0.059
	93		0.059
	114	0.176	
	115	0.441	
	116	0.029	
	117	0.059	
	119	0.059	
	120	0.088	
	121	0.029	
	122	0.059	
	125	0.059	

Allele List for Codominant Data		
Data Sheet	Final	
Data Title	Digitostigma	
No. Loci	2	
No. Samples	17	
No. Pops.	1	
Alleles	b6	h11

78	0	1
80	0	1
84	0	1
90	0	1
93	0	1
114	1	0
115	1	0
116	1	0
117	1	0
119	1	0
120	1	0
121	1	0
122	1	0
125	1	0
Total No. Alleles	9	5

De los someros análisis del Programa Arlequin se obtuvo lo siguiente:

Arlequin results

```

////////////////////////////////////
RUN NUMBER 1 (18/05/13 at 16:20:04)
////////////////////////////////////

```

Project information:

```

-----
NbSamples    = 1
DataType     = MICROSAT
GenotypicData = 1
GameticPhase = 0
RecessiveData = 0

```

```

=====
Settings used for Calculations
=====

```

General settings:

```

-----
Deletion Weight      = 1
Transition Weight Weight = 1
Tranversion Weight Weight = 1
Epsilon Value        = 1e-07
Significant digits for output = 5
Infer haplotype definition from distance matrix
Allowed level of missing data = 0.05

```

Active Tasks:

Standard indices:

Molecular Diversity:

Molecular Distance :No. of different alleles (FST)

GammaA Value = 0

Theta estimators :

Linkage disequilibrium test:

No. of permutations = 10000

No. of Initial conditions = 2

Print Histogram and table : No

Hardy-Weinberg equilibrium test:

No. of steps in Markov chain = 1000000

No. of Dememorisation Steps = 100000

Required precision on Probability = 0

Test association at the Locus level

Analysis of Molecular Variance:

No. of Permutations = 1000

Distance matrix:

Compute distance matrix

Molecular distance : No. of different alleles (FST)

Gamma a value = 0

=====
== ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL
=====

=====
=
== Sample : bajo torres cfe
=====

=====
== Standard diversity indices : (bajo torres cfe)
=====

Nei, M., 1987.

Garza, J.C., and Williamson, E.G. 2001.

No. of gene copies : 34

No. of loci : 2

No. of usable loci : 2 loci with less than 5.00 % missing data
 No. of polymorphic loci : 2

Results are only shown for polymorphic loci

```

-----
      Num.
      gene Num.  Obs.  Exp. Allelic  G-W
Locus# copies alleles  Het.  Het  range  stat.
-----
  1    34    9 0.11765 0.77362   11  0.75000
  2    34    5 0.41176 0.41355   15  0.31250
-----
Mean 34.000  7.000 0.26471 0.59358 13.000 0.53125
s.d.  0.000  2.828 0.20797 0.25461  2.828 0.30936
-----
  
```

```

=====
== Molecular diversity indices : (bajo torres cfe)
=====
  
```

- Tajima, F., 1983.*
- Tajima, F. 1993.*
- Nei, M., 1987.*
- Zouros, E., 1979.*
- Ewens, W.J. 1972.*

Sample size : 34.00000
 No. of haplotypes : 15

Allowed level of missing data : 5.00000 %
 Number of usable loci : 2

Distance method : No. of different alleles
 Average gene diversity over loci : 0.593583 +/- 0.433796

(Standard deviations are for both the sampling and the stochastic processes)

```

=====
== Pairwise linkage disequilibrium : (bajo torres cfe)
=====
  
```

- Slatkin, M. 1994a.*
- Slatkin, M. and Excoffier, L. 1996.*
- Lewontin, R. C., and K. Kojima 1960.*

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

```

-----
Permutation test using the EM algorithm
Number of permutations : 10000
Number of initial conditions for EM : 2
  
```

Pair(0, 1)

LnLHood LD : -70.93983 LnLHood LE : -83.08618

Exact P= 0.31673 +- 0.00428 (10100 permutations done) Chi-square test value=24.29269 (P = 0.83363, 32 d.f.)

Histogram of the number of linked loci per locus

Locus: 0 1

0 0

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

Locus # | 0| 1|

0 | * -

1 | - *

=====
== Hardy-Weinberg equilibrium : (bajo torres cfe)
=====

Guo, S. and Thompson, E. 1992.

Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :1000000

Dememorization steps :100000

Locus #Genot Obs.Het. Exp.Het. P-value s.d. Steps done

1 17 0.11765 0.77362 0.00000 0.00000 1001000

2 17 0.41176 0.41355 0.65485 0.00052 1001000

=====
==
== Summary of computations done within populations
=====
==

Basic properties

Statistics bajo torres cfe Mean s.d.

No. of gene copies	34	34.000	0.000
No. of loci	2	2.000	0.000
No. of usable loci	2	2.000	0.000
No. of polym. loci	2	2.000	0.000

Expected heterozygosity

Locus#	bajo torres cfe	Mean	s.d.	Tot. Het.
1	0.77362	0.77362	0.00000	0.77362
2	0.41355	0.41355	0.00000	0.41355
Mean	0.59358	0.59358	0.00000	0.59358
s.d.	0.25461	0.25461	0.00000	0.25461

Theta(H) under the stepwise mutation model

Locus#	bajo torres cfe	Mean	s.d.
1	9.25637	9.25637	0.00000
2	0.95380	0.95380	0.00000

Theta from

Mean H	1.57261	1.57261	0.00000
--------	---------	---------	---------

Number of alleles

Locus#	bajo torres cfe	Mean	s.d.	Tot. number
1	9	9.000	0.000	9
2	5	5.000	0.000	5
Mean	7.000	7.000	0.000	7.000
s.d.	2.828	2.828	0.000	2.828

Allelic size range

Locus#	bajo torres cfe	Mean	s.d.	Tot. range
1	11	11.000	0.000	11
2	15	15.000	0.000	15
Mean	13.000	13.000	0.000	13.000

s.d. 2.828 2.828 0.000 2.828

Garza-Williamson index

Locus# bajo torres cfe Mean s.d.

1 0.75000 0.75000 0.00000
2 0.31250 0.31250 0.00000

Mean 0.53125 0.53125 0.00000
s.d. 0.30936 0.30936 0.00000

Garza-Williamson modified index

Locus# bajo torres cfe Mean s.d.

1 0.75000 0.75000 0.00000
2 0.31250 0.31250 0.00000

Mean 0.53125 0.53125 0.00000
s.d. 0.30936 0.30936 0.00000

=====
=
== GENETIC STRUCTURE ANALYSIS
=====
=

Number of usable loci for distance computation : 2
Allowed level of missing data : 0.05000

List of usable loci :

1 2

List of loci with too much missing data :

NONE

=====
AMOVA ANALYSIS
=====

Genetic structure to test :

No. of Groups = 1

[[Structure]]

```
StructureName = "Digitostigma Structure"
NbGroups = 1
#Group1
Group={
  "bajo torres cfe"
}
```

Distance method: No. of different alleles (FST)

```
////////////////////////////////////
END OF RUN NUMBER 1 (18/05/13 at 16:20:13)
Total computing time for this run : 0h 0m 8s 717 ms
////////////////////////////////////
```