

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-
FISIOLOGÍA VEGETAL

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Echeveria laui* Moran & Meyrán

MARÍA GUADALUPE GODOY BELTRÁN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Morfogénesis *in vitro* de *Echeveria laui* Moran & Meyrán**, realizada por la alumna: **MARÍA GUADALUPE GODOY BELTRÁN**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

ASESOR



DR. ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES

ASESOR



DR. NICACIO CRUZ HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2021.

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Echeveria laui* Moran & Meyrán

María Guadalupe Godoy Beltrán, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Echeveria laui es una planta suculenta endémica de la región de Cuicatlán, Oaxaca México. Su notable belleza y rareza son atributos que la distinguen como planta ornamental. Actualmente se encuentra en peligro de extinción debido a la colecta desmedida y el comercio ilegal. El objetivo de esta investigación fue determinar las condiciones óptimas para la morfogénesis *in vitro* por organogénesis. Para la desinfección de semillas de cinco meses de edad se evaluaron cinco tratamientos [plata coloidal 3% v/v, Tween® 20 (0.5 % v/v), hipoclorito de sodio comercial al 20% v/v), etanol al 20% y agua destilada estéril]. La viabilidad se evaluó en semillas de tres meses cultivadas en medio MS con 5.8 µM de ácido giberélico (AG₃). La inducción de organogénesis y la multiplicación se evaluaron en explantes de hoja de 1-2 cm de longitud en medio MS con 6-bencilaminopurina (BAP) (0.0-15.5 µM), ácido indol acético (AIA) (1.0 µM) y ácido naftalenacético ANA (1.7 µM). Para el enraizamiento los brotes se cultivaron en medio MS con 50% de concentración de sales adicionado con ANA (0.0-10.6 µM), ácido indol-3-butírico (AIB) (0.0-9.1 µM). En aclimatación se evaluaron plántulas con cinco hojas y cuatro tipos de sustratos conformados por turba, perlita y tezontle. La desinfección de semillas fue eficiente con Tween 20® al 0.5% por 10 min y se obtuvo 44% de germinación. En la inducción de la organogénesis se obtuvieron 1.8 brotes por explante con medio MS adicionado con 11.1 µM de BAP, 1.0 µM de AIA y 1.7 µM de ANA después de 15 semanas de cultivo, En la fase de multiplicación de brotes la mejor combinación fue 11.1 µM de BAP+1.0 µM de AIA+ 1.7 µM de ANA con 1.9 brotes a las 12 semanas de cultivo. En el enraizamiento cada brote formó en promedio 16.6 raíces en medio MS con 50% de sales minerales. Durante aclimatación la supervivencia fue de 90% con perlita y turba (1:1).

Palabras clave: Crasulácea, suculenta, endémica, organogénesis, regeneración *in vitro*.

***In vitro* MORPHOGENESIS OF *Echeveria laui* Moran & Meyrán**

**María Guadalupe Godoy Beltrán, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021**

ABSTRACT

Echeveria laui is a succulent plant endemic to the Cuicatlán region, in Oaxaca Mexico. Its remarkable beauty and rarity are attributes that distinguish it as an ornamental plant. It is currently in danger of extinction due to excessive collecting and illegal trade. The objective of this research was to determine the optimal conditions for *in vitro* morphogenesis via organogénesis. For the disinfection of five-month-old seeds, five treatments were evaluated [colloidal silver 3% v/v, Tween® 20 (0.5% v / v), commercial sodium hypochlorite 20% v / v), 20% ethanol and sterile distilled water]. Viability was evaluated in three-month-old seeds grown in MS medium with 5.8 µM of gibberellic acid (AG₃). Organogenesis induction and multiplication were evaluated in 1-2 cm long leaf explants in MS medium with 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0-15.5 µM), indole acetic acid (IAA) (1.0 µM) and naphthaleneacetic acid. ANA (1.7 µM). For rooting, the shoots were cultivated in MS medium with 50% concentration of salts added with ANA (0.0-10.6 µM), indole-3-butyric acid (IBA) (0.0-9.1 µM). In acclimatization, seedlings with five leaves and four types of substrates made up of peat, perlite and tezontle were evaluated. Seed disinfection was efficient with 0.5% Tween 20® for 10 min and 44% germination was obtained. In the organogenesis induction, 1.8 shoots were obtained per explant with MS medium added with 11.1 µM of BAP, 1.0 µM of IAA and 1.7 µM of ANA after 15 weeks of culture. In the shoot multiplication phase the best combination was 11.1 µM of BAP + 1.0 µM of IAA + 1.7 µM of ANA with 1.9 shoots at 12 weeks of culture. During rooting, each shoot formed an average of 16.6 roots in MS medium with 50% mineral salts. During acclimatization, survival was 90% with perlite and peat (1:1).

Keywords Crassulaceous, succulent, endemic, organogénesis, *in vitro* regeneration.

DEDICATORIA

A mi padres Jorge Godoy Puebla† y Carolina Beltrán Maya, por las valiosas enseñanzas de vida a base del ejemplo, comunicación y tenacidad.

A mis hermanos Jorge, Mara, Marlene y María de Jesús por creer en mi y brindarme siempre su apoyo de manera incondicional.

“Que nadie corte tus emociones, que nadie corte tus alas, que nadie corte tus sueños...”

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Posgraduados por brindarme la oportunidad de cursar los estudios de posgrado, por el apoyo y facilidades prestadas.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) quien me proporcionó el sustento económico para poder culminar mis estudios de posgrado.

A mi padres y hermanos por el apoyo y confianza en este proyecto.

Dra. Ma. Cristina Guadalupe López Peralta, muchas gracias por su asesoría, paciencia y los valiosos aportes que me enriquecieron para crecer y formarme académicamente en este nivel. Muchas gracias por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento.

Dr. Eleodoro y Dr. Nicacio por la orientación, colaboración y apoyo que me brindaron en este proyecto.

Laura Tovar técnico del Laboratorio de Biotecnología, por los ánimos, apoyo y amistad durante el desarrollo de este proyecto.

Mis agradecimiento a mi familia COLPOS Yazmin, Victoria, Sigrid, María de Jesús, Deysi, Eliud, Carlos, Adriana y Jorge por encontrar siempre en ellos apoyo, amistad y sabiduría en todo momento.

Muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTAS DE CUADROS	x
LISTAS DE FIGURAS	xi
ÁPÉNDICE.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
2.3 Hipótesis	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 Generalidades de la familia Crassulaceae.....	5
3.1.1 Descripción botánica.....	5
3.1.2 Taxonomía.....	5
3.1.3 Importancia económica.....	6
3.1.4 Importancia ecológica	7
3.1.5 Requerimientos del cultivo	7
3.1.6 Cultivo comercial.....	8
3.1.7 Propagación de crasuláceas.....	9
3.2 Género <i>Echeveria</i>	9
3.2.1 Taxonomía.....	10
3.2.2 Morfología.....	12
3.3 Generalidades de <i>Echeveria laui</i>	16
3.3.1 Importancia del género	16
3.3.2 Taxonomía.....	17
3.3.3 Descripción botánica.....	18
3.3.4 Ambiente.....	18

3.3.5 Categorías y factores de riesgo	18
3.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	19
3.4.1 Totipotencia celular	19
3.4.2 Morfogénesis <i>in vitro</i>	20
3.4.3 Organogénesis <i>in vitro</i>	20
3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos <i>in vitro</i>	21
3.5.1 Genotipo	22
3.5.2 Explante	22
3.5.3 Medio de cultivo	23
3.5.4 Reguladores del crecimiento vegetal	24
3.5.5 Auxinas	24
3.5.6 Citocininas	25
3.5.7 Giberelinas	26
3.5.8 Fuente de carbono y suplementos no definidos	26
3.5.9 Antioxidantes y absorbentes	27
3.6 Cultivo <i>in vitro</i> de crasuláceas	27
3.6.1 Medios de cultivo	28
3.6.2 Tipos de explantes utilizados <i>in vitro</i>	30
3.6.3 Reguladores del crecimiento	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Material vegetal	32
4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación	32
4.3 Cultivo aséptico y germinación <i>in vitro</i>	33
4.3.1 Variables cuantificadas	33
4.4 Viabilidad de semillas	34
4.4.1 Variables cuantificadas	34
4.5 Regeneración <i>in vitro</i> de plantas por organogénesis directa	34
4.5.1 Inducción de brotes	34
4.5.2 Multiplicación de brotes	36
4.5.3 Enraizamiento de brotes	37
4.5.4 Aclimatación de plántulas	38

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	41
5.2 Germinación <i>in vitro</i>	42
5.3 Viabilidad de semillas.....	44
5.4 Regeneración <i>in vitro</i> de plantas por organogénesis directa	45
5.4.1 Inducción de brotes.....	45
5.4.2 Multiplicación de brotes	48
5.4.3 Enraizamiento de brotes	49
5.4.4 Aclimatación de plantas	51
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. LITERATURA CITADA	59
APÉNDICE.....	70

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la inducción de brotes de <i>Echeveria laui</i> a partir de hojas de plántulas <i>in vitro</i>.....	35
Cuadro 2. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la multiplicación de brotes de <i>Echeveria laui</i>.....	36
Cuadro 3. Concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) evaluadas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de <i>Echeveria Laui</i>.....	37
Cuadro 4. Desinfección superficial de semillas de <i>Echeveria laui</i> con diferentes agentes.....	42
Cuadro 5. Brotación (B, %) y número de brotes por explante (BE) inducidos a partir de hojas de <i>Echeveria laui</i> con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftanelacético (ANA) a las cinco, diez y doce semanas de cultivo.....	47
Cuadro 6. Brotación (B, %), número de brotes por explante (BE), y porcentaje de formación de callo (C, %) en explantes de hoja de <i>Echeveria laui</i> con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftanelacético (ANA) a las cinco, diez y doce semanas de cultivo.....	48
Cuadro 7. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de <i>Echeveria laui</i> en medio MS con 50% de concentración de sales, ácido naftanelacético (ANA) y ácido indo-3-butírico (AIB) a las ocho semanas de cultivo.	50
Cuadro 8. Aclimatación de plantas <i>in vitro</i> de <i>Echeveria laui</i> en diferentes sustratos.	52

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar joven de <i>Echeveria laui</i> (fotografía tomada 26 de marzo, 2021).....	17
Figura 2. <i>Echeveria laui</i> . (a) Ejemplar adulto; (b) semillas.	32
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología evaluada para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Echeveria laui</i>	40
Figura 4. Germinación <i>in vitro</i> de plantas de <i>Echeveria laui</i> . a) Plántula de cuatro semanas de cultivo; b) Plántula de ocho semanas de cultivo.	43
Figura 5. Inducción de brotes a partir de hoja de <i>Echeveria laui</i> . a) Brotes cultivados en medio MS con 11.1 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA; b) Callo friable inducido en explante de hoja en medio MS con 3.4 μM de BAP y 1.7 μM de AIA.	46
Figura 6. Multiplicación de brotes de <i>Echeveria laui</i> . a) Brote después de 12 semanas de cultivo en medio MS con 11.1 μM de BAP+1 μM de AIA+1.7 μM de ANA; b) Callo friable formado después de 12 semanas de cultivo en medio MS con 3.4 μM de BAP, 1.0 de AIA μM y 1.7 μM de ANA.	49
Figura 7. Plantas enraizadas de <i>Echeveria laui</i> en medio MS con 50% de concentración de sales. a) Planta después de 4 semanas de cultivo; b) Planta después de 8 semanas de cultivo.....	51
Figura 8. Aclimatación de plantas de <i>Echeveria laui</i> después de 12 semanas. a) Planta en mezcla de turba y perlita (1:1); b) Planta en mezcla de turba y tezontle (1:1); c) Planta con ocho hojas y raíz desnuda; d) Planta aclimatada a condiciones de invernadero.....	53
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología establecida y resultados significativos de la morfogénesis (regeneración por organogénesis directa) <i>in vitro</i> de <i>Echeveria laui</i>	56

ÁPÉNDICE

Apéndice 1. Composición química del medio de cultivo básico de Murashige	70
Apéndice 2. Cuadrados medios y su significancia del análisis del número de brotes y la brotación in vitro de Echeveria laui después de cinco, diez y quince semanas de cultivo.....	71

I. INTRODUCCIÓN

En México se presentan casi todos los climas del planeta y junto con su topografía accidentada y geología compleja permiten que se desarrollen prácticamente todos los ecosistemas terrestres presentes en el mundo (Sarukhán *et al.*, 2009). México posee gran diversidad de especies con el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM). Estas especies pueden habitar en sitios donde la disponibilidad de agua es limitada, tales como zonas áridas y semiáridas y las copas de los árboles, o como hidrófitas en sitios con poca disponibilidad de CO₂ (Andrade *et al.*, 2007).

La principal familia botánica representativa del metabolismo CAM son las Crasuláceas. Los miembros de esta familia se caracterizan por sus adaptaciones morfológicas que les permiten habitar sitios con restricciones de humedad. Dichas características son la succulencia en diferentes órganos, principalmente de hojas y tallos; hojas con cutícula gruesa y con frecuencia pruinosa, cerosa o pubescente; hábito en roseta, y crecimiento apiñado o efuso (Denton, 1982). Estas adaptaciones les permiten sobrevivir en sitios con afloramientos rocosos, como riscos, laderas escarpadas, paredes de cañadas y cañones o, en su defecto, crecen como epífitas.

Muchas especies de crasuláceas son demandadas, colectadas y propagadas con fines ornamentales por aficionados y horticultores. Algunas de ellas, dada su belleza, son consideradas como favoritas por diversos cultivadores y coleccionistas. Varias especies de la familia se reportan como medicinales y otras más como venenosas (Pérez-Calix, 2008).

El género *Echeveria* se ubica en la familia Crassulaceae y está conformado por alrededor de 127 especies, de las cuales 83% se restringen exclusivamente al territorio mexicano (Reyes y Brachet 2009). Las poblaciones silvestres de *Echeveria* han sido seriamente afectadas por actividades humanas, como la agricultura, la ganadería, la construcción de vías de comunicación, los asentamientos humanos y la sobreexplotación de ejemplares para el comercio ilegal. De la misma manera, hay temporadas en que se intensifica la

extracción, práctica ilegal que las ha puesto al borde de la extinción (Cabrera-Luna *et al.*, 2007).

Echeveria laui es una planta suculenta endémica de México, específicamente de la región de Cuicatlán, Oaxaca (Reyes *et al.*, 2004). Es una planta carnosa acaule con forma de roseta, mide hasta 30 cm de diámetro, produce inflorescencias con flores de color rojo de aspecto rosado (CONABIO, 2016) y sus hojas están cubiertas de cera abundante. Esta planta ha sido sujeto de colecta y comercio ilegal, debido a su notable belleza, rareza y a su restringida abundancia y distribución (Piña-Poujol *et al.*, 2007). Esta especie es difícil de cultivar debido al reducido porcentaje de germinación y alta tasa de mortalidad durante el manejo del cultivo cuando se propaga de manera asexual (Arias *et al.*, 2005).

Por estas razones, la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) de especies amenazadas clasificó a la especie en la categoría de “*en peligro de extinción*” (SEMARNAT, 2010). Este distintivo la ubica dentro de aquellas especies cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural. Los factores que han propiciado esta situación son la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros.

Dada la importancia ecológica y económica que representa *E. laui* como recurso fitogenético para las zonas semiáridas del territorio nacional y para el sector ornamental, se requieren de estudios que contribuyan al rescate, conservación y aprovechamiento sostenible de la especie. Una opción importante es el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* cuyas técnicas de propagación a partir de semillas o partes de la planta son ideales para multiplicar especies amenazadas o que son difíciles de propagar por métodos convencionales. Los principales avances del cultivo *in vitro* de tejidos han permitido la multiplicación de especies de interés mediante organogénesis y embriogénesis somática (Daquinta *et al.*, 2000; Barbón *et al.*, 2006). Estas técnicas ofrecen una serie de ventajas como la posibilidad de reproducir gran cantidad de plantas homogéneas y de muy alta

calidad fitosanitaria, en un menor plazo de tiempo y en espacios reducidos (Sharry *et al.*, 2015).

Con base en estos antecedentes y con el propósito de disponer de un método de propagación asexual alternativo para *Echeveria Laui*, ya que a la fecha no se cuenta con este, la finalidad de la presente investigación fue evaluar la morfogénesis *in vitro* de *E. laui* desde la germinación *in vitro* hasta la regeneración *in vitro* de plantas por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Establecer la morfogénesis *in vitro* de *Echeveria laui* a partir de la germinación de semillas y regeneración de plántulas por organogénesis directa.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un procedimiento de desinfección de semilla efectivo para establecer el cultivo aséptico de *Echeveria laui*.
- Evaluar la viabilidad de semillas de *Echeveria laui*.
- Determinar las condiciones de medio de cultivo y reguladores del crecimiento óptimos para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de *Echeveria laui* vía organogénesis directa.
- Definir las condiciones de medio de cultivo y reguladores del crecimiento óptimos para el enraizamiento de plántula de *Echeveria laui*.
- Establecer el proceso de aclimatación de plantas de *Echeveria laui* obtenidas *in vitro*.

2.3 Hipótesis

- El establecimiento del cultivo aséptico de semillas de *Echeveria laui* está determinado por el tipo y concentración del agente desinfectante empleado.
- Las respuestas morfogénicas de *Echeveria laui* dependen de las concentraciones de reguladores de crecimiento empleadas en cada etapa de la ruta morfogénica.
- Es posible aclimatar plántulas obtenidas *in vitro* de *Echeveria laui*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades de la familia Crassulaceae

3.1.1 Descripción botánica

Crassulaceae, también conocida como la familia de los cultivos de piedra o la familia orpine, en el orden de las saxifragales, es una familia de plantas con flores dicotiledóneas. Consta de 34 o 35 géneros con aproximadamente 1,400 especies, generalmente herbáceas, ocasionalmente subarborescentes o arbustos, en todo el mundo distribuidos, principalmente en el hemisferio norte y el sur de África. Los tallos son en su mayoría suculentos. Las hojas suelen ser simples, alternas, opuestas o verticiladas, sésiles y estipuladas. Las hojas están enteras o con una incisión leve. Las flores son bisexuales, rara vez unisexuales, actinomorfas, 4 o 5-meras o de multiplicación, terminales o axilares, generalmente dispuestas en cimosas, corimbiformes, espiculadas, racemosas, paniculadas u ocasionalmente solitarias. Sépalos y pétalos libres o connatos. Los estambres son isómeros o dos veces como pétalos, en dos series cuando son dobles a los pétalos. Por lo general, los estambres externos son opuestos a los pétalos. Las anteras son basales, ocasionalmente dorsifijas e intrínsecamente dehiscentes. Los carpelos son isómeros con pétalos, libres o connados en la base y, a menudo, con escamas de néctar en la base o cerca de ella. Los óvulos son de varios a numerosos en la placenta parietal. La fruta es un folículo, rara vez una cápsula, de una a muchas semillas. Las semillas son pequeñas, el endospermo escaso o está ausente (Xu y Deng, 2017).

3.1.2 Taxonomía

Crassulaceae es una familia dividida en seis subfamilias basándose en una variedad de caracteres morfológicos (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004). Normalmente ha sido considerada un grupo natural y análisis moleculares filogenéticos indican que la familia es monofilética (Mort *et al.*, 2005). Solo existen dos linajes mayores, uno es el “linaje

Crassula”, que incluye géneros de tres de las subfamilias tradicionales, Crassuloideae, Cotyledonoideae, y Kalanchoideae, que se encuentran predominantemente en el sur de África. El segundo es el “linaje *Sedum*”, que incluye géneros de las otras tres subfamilias: Echeveroideae, Sedoideae y Sempervivoideae, se encuentra predominantemente en el Hemisferio Norte (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004).

El género *Echeveria* está formado por plantas generalmente muy suculentas, con hojas dispuestas en una roseta basal o apical en las ramas, también pueden presentarse distribuidas a lo largo del tallo en forma opuesta, alterna o verticilada; sus flores presentan simetría radial, son completas, por lo usual pentámeras y a veces tetrámeras; presentan uno o dos verticilos de estambres; el gineceo es súpero, con los carpelos libres y en el mismo carpelo. La integran cerca de 1,500 especies repartidas en 33 géneros (Thorne, 2000).

La mayoría de los elementos del grupo muestran preferencia por sitios con afloramientos rocosos tales como riscos, laderas escarpadas, paredes más o menos verticales de cañadas y cañones, o en su defecto, se presentan como epífitas (Pérez-Calix y Franco-Martínez, 2004); esto gracias a que presenta adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir al medio ambiente xérico, como la suculencia de sus hojas y tallos, la disposición arrosetada de sus hojas, cutícula gruesa, una cera o pubescencia protectora y el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), entre otras.

3.1.3 Importancia económica

Muchas crasuláceas son buscadas, colectadas y propagadas con fines ornamentales por aficionados y horticultores. Algunas especies, dada su belleza, son consideradas como favoritas por diversos cultivadores y coleccionistas. Varios miembros de la familia se reportan como medicinales y otras pocas como venenosas. (Pérez-Calix, 2008). Con el descubrimiento de muchas especies nuevas muy atractivas, aumentó el interés por acumular colecciones de estas plantas, aproximadamente 600 especies de *Echeverias* se producen y venden en todo el mundo (Lorraine *et al.*, 2005)

Su aprovechamiento como plantas de ornato se ha incrementado en países como Inglaterra, Estados Unidos, Alemania, Australia, Japón y Corea del Sur. Cabe señalar que el gusto por estas plantas sigue en aumento y por este motivo empieza a cobrar mayor importancia en estos países donde se están propagando por semilla, las cuales se obtiene a partir de plantas madre colectadas en campo (Reyes *et al.*, 2001). México aún no figura en la lista de productores de Echeverias a nivel mundial, a pesar de la gran diversidad de especies (Reyes *et al.*, 2014).

3.1.4 Importancia ecológica

México es uno de los principales países mega diversos del planeta, los cuales se caracterizan por poseer casi 70 % de la diversidad mundial de flora y fauna. Según datos de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2016), México alberga 23,424 especies de plantas y 2,954 especies de animales.

Entre las principales funciones ecológicas del género *Echeveria*, y de otras crasuláceas, se encuentran muchas que pueden considerarse pioneras en el proceso de sucesión ecológica pues son de las primeras plantas en colonizar los espacios originados por disturbios ambientales y/o antropogénicos, ya que son muy eficientes en el aprovechamiento de los recursos que, en esta primera etapa, tienen una disponibilidad reducida. Las crasuláceas contribuyen en las primeras etapas de la sucesión a la formación de suelo (pedogénesis), fragmentado la roca, añadiendo materia orgánica y reteniendo el suelo recién formado (Martínez, 2009).

3.1.5 Requerimientos del cultivo

Dependiendo del lugar en el que se tengan (macetas, jardineras, en el suelo directo, en jardines de roca, en invernadero o en sombreaderos) las plantas desarrollaran sus formas y colores dependiendo de que tanta exposición tengan al sol. La ubicación de la planta con respecto a la luz es el factor más importante para determinar su salud y apariencia (Reyes-Santiago *et al.*, 2011). Cabe mencionar que las crasuláceas son

plantas tipo CAM, que a diferencia de las plantas C3 y C4, asimilan CO₂ atmosférico en ácidos de cuatro carbonos, principalmente de noche y subsecuentemente, lo fijan durante el siguiente día vía ciclo de Calvin. Las estomas de las plantas CAM permanecen abiertos durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día, dando como resultado una pérdida mínima de agua y fotorrespiración reducida (Herppich y Peckmann, 2000). Los individuos con metabolismo CAM pueden crecer en sitios donde la disponibilidad de agua o CO₂ es escasa (Taiz y Zeiger, 2002; Larcher, 2003; Andrade *et al.*, 2007), ya que poseen características fisiológicas y morfológicas que les permiten sobrevivir y crecer en condiciones de déficit hídrico (Silva *et al.*, 2001).

En general las crasuláceas pueden vivir en cualquier tipo de sustrato sin ningún problema siempre y cuando se tenga en consideración ciertos aspectos. Es posible utilizar tierra lama, de hoja o negra; composta; peat moss o turba; fibra de coco o cualquier mezcla de las anteriores, y a su vez incorporarla con un material inerte y ligero, como gravilla, tepojal, tezontle o agrolita, para proporcionar a la planta sustrato aireado y bien drenado. El sustrato ideal debe contener suficientes nutrientes para mantener a la planta por lo menos durante un año y sobre todo contar con el drenado adecuado para evitar la acumulación de agua al interior de la maceta (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

El mayor peligro para las crasuláceas, especialmente si se tienen en exterior, son las pequeñas orugas de mariposa (lepidoptera), también la mosca negra. El mosco fungoso o *fungus gnat* es un peligro cuando está en estado larval por que daña las raíces de las plantas, especialmente de las plántulas, y puede arruinar por completo el cultivo en poco tiempo. Los caracoles y babosas, que proliferan en sitios húmedos y temporadas de lluvia, consumen las hojas jóvenes y brotes tiernos (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

3.1.6 Cultivo comercial

Meyrán y López (2003) reportan que estas plantas son muy apreciadas en jardinería y se han usado con frecuencia en arreglos de prados, jardines rocosos, bancales y repisas de ventana.

Muchas crasuláceas tienen interés ornamental y constantemente son recolectadas en campo para su venta o bien son propagadas por semilla o vegetativamente por parte de aficionados y horticultores para ser comercializadas (Pérez-Cálix, 2008). Varias especies de esta familia tienen uso medicinal como *Sedum dendroidreum*, que es cultivada por sus propiedades para la gastritis y como antiinflamatorio (Monroy *et al.*, 2012). *Hylotelephium telephium* y *Kalanchoe daigremontiana* son utilizadas para cicatrizar heridas en la piel (La Troje Sierra Norte, 2014).

3.1.7 Propagación de crasuláceas

Las plantas suculentas se multiplican por reproducción sexual mediante semillas y la propagación vegetativa mediante yemas, esquejes, vástagos, injertos y hojas. La propagación o multiplicación de las suculentas mediante el empleo de métodos convencionales representan una alternativa viable para los países que carecen de tecnologías y recursos económicos para el aprovechamiento comercial de sus recursos naturales. Por ejemplo, los cactus se pueden propagar a escala comercial debido a su bajo costo, lo cual se ajusta a las necesidades de México que no cuenta con grandes laboratorios para la producción comercial de plantas con potencial ornamental (Reyes *et al.*, 2001). Algunos jardines botánicos cuentan con importantes colecciones de plantas y semillas de cactáceas y crasuláceas de varias regiones de México (Franco, 1997).

3.2 Género *Echeveria*

El género *Echeveria* es un grupo exclusivo de América. México es el centro de mayor diversidad y endemismo de este grupo de plantas (Thiede, 1995; Meyrán y López, 2003). Está conformado por alrededor de 127 especies, de las cuales 83% se restringen exclusivamente al territorio mexicano (Reyes y Brachet, 2009). La riqueza de especies del género *Echeveria* en el estado de Tamaulipas y zonas aledañas a Nuevo León y San Luis Potosí marcó el inicio de un estudio florístico de la familia Crassulaceae y, particularmente, del género *Echeveria*. Walther (1972) reportó para Tamaulipas seis especies de *Echeveria* (*E. mucronata* Schltldl., *E. rosea* Lindl., *E. runyonii* Rose, *E.*

semivestita Moran Var. *floresiana* Walther, *E. shaviana* Walther y *E. walpoleana* Rose), la mayoría de ellas distribuidas a lo largo de la Sierra Madre Oriental, la cual abarca parte de la zona sur y oeste del estado. Sin embargo, con el paso de los años, y por medio de exploraciones más recientes, el estado de Oaxaca se ha reconocido como el más rico en *Echeveria*: en la actualidad existen 47 especies conocidas y la mayoría son endémicas, tales como *E. procera* Moran, *E. chazaroi* Kimnach, *E. mondragoniana*, *E. moranii* y *E. Walther*, por mencionar algunas (Reyes y Brachet, 2009).

Desde el descubrimiento de América, y hasta la actualidad, las poblaciones silvestres de *Echeveria* han sido seriamente afectadas por actividades humanas, tales como la agricultura, ganadería, la construcción de vías de comunicación, los asentamientos humanos y la sobreexplotación de ejemplares para el comercio ilegal. De la misma manera, hay temporadas en que se intensifica la extracción, práctica ilegal que las ha puesto en riesgo de extinción, como se reconoce en la Norma Oficial Mexicana 059 publicada en el Diario Oficial de la Federación desde 1994 (Cabrera-Luna *et al.*, 2007).

3.2.1 Taxonomía

Los estudios filogenéticos moleculares han modificado profundamente la idea de la evolución y, consecuentemente, la clasificación de muchos grupos de plantas, incluida las de la familia *Crassulaceae*. Los primeros estudios publicados se apoyaban en los sitios de restricción de ADN de cloroplasto (AFLPs) (Van Ham y Hart, 1998) y en secuencias de la región cloroplástica *matK* (Mort *et al.*, 2001). Ambos estudios encontraron evidencia de una historia evolutiva y un agrupamiento diferente a los propuestos por Berger en 1930.

Se ha encontrado evidencia de la existencia de siete linajes principales designados como clados: *Crassula*, *Kalanchoe*, *Telephium*, *Sempervivum*, *Leucosedum*, *Aeonium* y *Acre*. Mayuzumi y Ohba (2004) identificaron posteriormente un octavo clado: *Rhodiola*. Con base en esta evidencia y de acuerdo a la convención de clasificar a los organismos según su origen, Thorne y Reveal (2007) reconocieron únicamente dos subfamilias:

Crassuloideae y *Sempervivoideae*, mientras que Thiede y Eggli (2007) reconocieron además a *Kalanchoideae*. Esta última propuesta de tres subfamilias parece haber tenido una aceptación más amplia.

Con este último esquema clasificatorio, todas las crasuláceas nativas de México – excepto *Crassula* (Tillaea), representado por unas pocas especies– pertenecen a la subfamilia *Sempervivoideae*. Esta subfamilia es la más grande de la familia y se compone de cinco tribus (Thiede y Eggli, 2007). *Echeveria* se ubica en la tribu *Sedeeae*, particularmente en un grupo con categoría de subtribu que es conocido informalmente como clado *Acre*. La clasificación infragenérica más difundida para *Echeveria* es la propuesta por Walther (1972) quien dividió al género en 14 series. Sin embargo, Kimnach (2003) reconoció 17 series.

A la fecha no se ha hecho un estudio para esclarecer el origen y las relaciones evolutivas de las especies de *Echeveria*, ya sea con datos moleculares o morfológicos, sin embargo, se han realizado algunas investigaciones filogenéticas basadas en secuencias de ADN, en morfología o en combinación de ambas, pero dirigidas a *Graptopetalum* (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004), al género *Thompsonella* o al clado *Acre* (Carrillo-Reyes *et al.*, 2008).

Todos los estudios sugieren que el género *Echeveria* es parafilético, es decir, que no todas las especies que lo integran provienen de un ancestro común y que los géneros *Graptopetalum*, *Thompsonella* y *Cremnophila*, así como algunos representantes de *Sedum* (principalmente de la sección *Pachysedum*) pertenecen al mismo linaje y están estrechamente relacionados con distintas especies de *Echeveria*. La delimitación de *Echeveria* aún sigue siendo tema de debate. Aunque hace falta un estudio específico que aborde el problema del género, la evidencia que hasta ahora se ha obtenido complica el reconocimiento de *Echeveria* como una entidad natural (monofilética). Muy probablemente en un futuro este género sufrirá cambios profundos como pueden ser la incorporación de más géneros o el desmembramiento en otros más pequeños (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

3.2.2 Morfología

Raíz: Existen dos tipos de raíces: fibrosas y fusiformes. En el primer caso no se distingue una raíz principal y es fácilmente desprendible del sustrato; en varias ocasiones dichos sustratos son rocosos por lo que parte de la raíz es epígea; también es posible observar en ejemplares colgantes como en *Echeveria uhlii* y *E. peacockii* la formación de una raíz aérea principal sumamente resistente que sostiene muy bien a la roseta, y se fija por raíces fibrosas pequeñas y delgadas al sustrato. El tipo de raíz fusiforme solo se presenta en las especies de la serie Mucronatae (Walther, 1972). *E. mucronata* y *E. crassicaulis* tienen una raíz central suculenta de donde salen raíces fibrosas delgadas y este carácter sirve para separar las series Mucronatae y Racemosae (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Tallo: Los tallos pueden variar desde un cáudex (tallo perenne, corto, grueso y generalmente subterráneo), como en *E. derenbergii*, hasta presentar elongaciones de 2 m, como en *E. coccinea*, y con grosores de hasta 8 cm, como en *E. gigantea*. Pueden ser simples, como en *E. chiapensis* y *E. longissima*, o muy ramificados, como en *E. sedoides*, *E. pulvinata* y *E. coccinea* (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Hoja: El género presenta hojas suculentas, simples y con filotaxia espiralada, por lo que las rosetas pueden variar desde muy laxas, o muy densas, como en *E. laui*. El color de las hojas muestra diferentes tonalidades de verde: claro o sumamente oscuro en ocasiones se observa la presencia de máculas rojas. Son sésiles, sin estípulas, generalmente enteras, algunas con márgenes dentados, o ciliados en ocasiones ligeramente sinuados también pueden presentar el margen de color rojo (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Pueden tener un grosor de hasta 1 cm en su porción media, como en *E. purpurorum* y *E. derenbergii*, o tan sólo medir 0.1 mm. Presentan diferentes formas, desde obovadas como en *E. laui* y *E. pulvinata*, oblongas-trianguulares o finalmente; la forma más común en el género: *obovadascuneadas*. Los tamaños también varían: las hojas más pequeñas están presentes con 1.5 cm de largo, mientras que las más grandes le pertenecen a *E.*

gigantea con 30 cm. Presentan diferentes tipos de indumento: pueden tener un revestimiento blanquecino superficial ceroso, semejante a una cubierta de polvo fino y diminuto, que se observa muy bien en especies como *E. laui* y *E. peacockii*, que tienen hojas pruinosas o pulverulentas, aunque hay otras donde la pruinosis es más ligera. También se observa la presencia de cilios o tricomas que les dan una apariencia aterciopelada. Los cilios pueden ser un poco más largos, gruesos y separados como en *E. setosa* o la superficie puede ser glabra como en *E. heterosepala*, *E. gracilis*, *E. sedoides*, *E. chiapensis*, *E. megacalix*, *E. mucronata*, *E. crassicaulis* y *E. longissima*. (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Inflorescencia: El género presenta una inflorescencia lateral y axilar compuesta por un tallo floral o pedúnculo que sostiene a las flores y brácteas; estas últimas son generalmente de color y forma similares a las hojas, pero más pequeñas y pueden ser fácilmente desprendibles o estar fuertemente adheridas. Hay dos tipos básicos de inflorescencia: el cincino y el racimo. En el primer tipo las flores se acomodan en zigzag formando dos líneas paralelas muy cercanas que dan la apariencia de que todas ellas están en un solo plano; generalmente el cincino se curva y se endereza conforme se van abriendo las flores (Moran y Uhl, 1964), aunque también es usual que permanezca en posición decumbente. Se observaron bracteolas en las flores de *E. heterosepala* y *E. amoena*. Algunos ejemplos de especies con inflorescencia de tipo cincino son *E. laui*, *E. subalpina* y *E. peacockii*.

Los sépalos en el género *Echeveria* varían en tamaño y posición con respecto a la corola. Pueden ser de tamaño notable, como en *E. rosea*, especie que presenta un cáliz adpreso, casi de la misma longitud que la corola, con sépalos ligeramente desiguales, lanceolados y con un color vino muy llamativo. Sin embargo, es más usual observar los cálices de tamaño medio, semiextendidos y semiascendentes como en *E. mucronata* o bien, extendidos, como en *E. nodulosa* y *E. sedoides*, aunque en esta última especie son pequeños, de apenas un tercio de la corola; o adpresos. También los hay de longitud

desigual, como en *E. laui*, donde además presentan la pruinosidad característica de la especie (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Corola: La corola tubular y de colores brillantes son dos de las características del género. Generalmente los pétalos exhiben una fuerte quilla, lo que da una mayor rigidez a la corola. La quilla puede también ser muy ligera, por lo que la corola es casi circular. Igualmente, la longitud presenta un gradiente de variación: pueden ser muy pequeñas, desde 0.8 cm o muy largas, hasta 3.1 cm. Los colores fluctúan desde los tonos claros, como el naranja de *E. derenbergii* y *E. laui*, o el rosa salmón; hasta colores llamativos, como el amarillo y verde; e intensos, como el rojo con amarillo (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Ecología y hábitad natural: El género está representado en una amplia variedad de ambientes. Crecen dentro de bosques de pino y encino, en las diferentes asociaciones de los matorrales xerófilos y se presentan, aunque ya de manera escasa, en las selvas bajas caducifolias. Usualmente las plantas se localizan en manchones muy pequeños sobre áreas a las que se les ha denominado enclaves xerofíticos, que no son más que sitios rocosos que se encuentran dentro de los tipos de vegetación anteriormente mencionados (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Las especies del género tienen preferencia por este tipo de hábitats; que pueden ser acantilados, pendientes escarpadas o simplemente mesetas rocosas. Su exposición a la luz es en ocasiones directa, o bien, puede estar atenuada por la vegetación circundante o por la protección que brinda la misma oscuridad donde crece; también pueden establecerse en la cara norte de las laderas, donde la insolación es menor. En caso de que la planta esté expuesta directamente al sol, se encuentra protegida por sus características morfológicas (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

De acuerdo con Pérez-Cálix (2008) algunas especies como *Echeveria bifida*, *E. humilis* y *E. tolimanensis* están ligadas exclusivamente a afloramientos calizos; otras se presentan únicamente sobre rocas ígneas, por ejemplo *E. agavoides*, *E. calderoniae*, *E.*

fulgens y *E. gibbiflora*; mientras que otras no muestran preferencia por un tipo de roca y algunas, incluso, son epífitas. Las comunidades de echeverias presentes en México se han encontrado desde los 180 hasta cerca de los 4,010 msnm. La especie que se ha encontrado a menor altitud es *Echeveria pallida* mientras que a mayor altitud está *Echeveria secunda*, conocida como “alpina” (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Capacidad de regeneración natural: Los estudios ecológicos del género *Echeveria* son muy limitados, por lo tanto, no es posible establecer conclusiones generalizadas acerca de la capacidad regenerativa de las poblaciones de los taxa del género. Esta carencia es general para toda la familia, sin embargo, algunos patrones solo se han observado y en algunos casos han sido documentados. Las evidencias sugieren que las poblaciones de *Echeveria* están disminuyendo. En muchas especies el reclutamiento de nuevos individuos ocurre ocasionalmente y bajo condiciones muy particulares (Martorell, 2007; Piña-Poujol *et al.*, 2007), especialmente en aquellos taxa distribuidos en ambientes donde la humedad es esporádica.

El crecimiento para algunas especies puede ser lento por los disturbios naturales, tales como periodos prolongados de sequía, depredación por fauna y enfermedades de las plantas. También están los disturbios antropogénicos, como el cambio de uso de suelo, el pastoreo, la extracción de individuos reproductivos y la destrucción del hábitat. Estos factores pueden reducir drásticamente los números poblacionales en el corto, mediano y largo plazo, y conducir a la extinción a las poblaciones (Martorell, 2007).

En *Echeveria*, como en otros grupos de plantas, existe una relación entre el tamaño de los individuos con la fecundidad: entre mayor es el tamaño mayor es la fecundidad, por lo que la extracción de los individuos más grandes representa un impacto negativo sobre las poblaciones; no obstante, éstas tienen la capacidad de regenerarse por sí mismas, pues en ocasiones el disturbio antropogénico abre nuevos espacios que pueden ser colonizados por nuevos individuos, ya que aparentemente algunas especies de *Echeveria* y otras crasuláceas presentan un comportamiento metapoblacional (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

Algunos patrones observados muestran que la dinámica de las poblaciones en *Echeveria* depende del ciclo de vida particular de cada especie, de los procesos demográficos que rigen la dinámica poblacional y también del tipo de reproducción dominante. Es posible que en diferentes condiciones ambientales la misma población se modifique, es decir, en años con precipitaciones elevadas puede imperar la reproducción sexual y en los períodos secos puede predominar la asexual (Reyes-Santiago *et al.*, 2011).

3.3 Generalidades de *Echeveria laui*

En 1974 Alfredo Lau colectó una planta del género *Echeveria* (Crassulaceae) que, por sus características, se consideró como una especie aún no descrita. Posteriormente Reid Morán y Jorge Meyrán describieron a la especie y le dieron el nombre de *Echeveria laui* (Morán y Meyrán, 1976). Es una planta suculenta endémica de México, pertenece a la familia Crassulaceae. Es una planta carnosa acaule con forma de roseta, mide hasta 30 cm de diámetro, produce una inflorescencia con flores color rojo de aspecto rosado, debido a la capa pruinosa que la cubre (CONABIO, 2016).

3.3.1 Importancia del género

Echeveria laui (Figura 1) es una planta con metabolismo MAC (Reyero, 2009), su forma de crecimiento es arrosetada con hojas suculentas y raíces poco desarrolladas (Walther, 1972). *E. laui* es endémica de la región de Cuicatlán, Oaxaca donde el clima es semiárido (Reyes *et al.*, 2004).

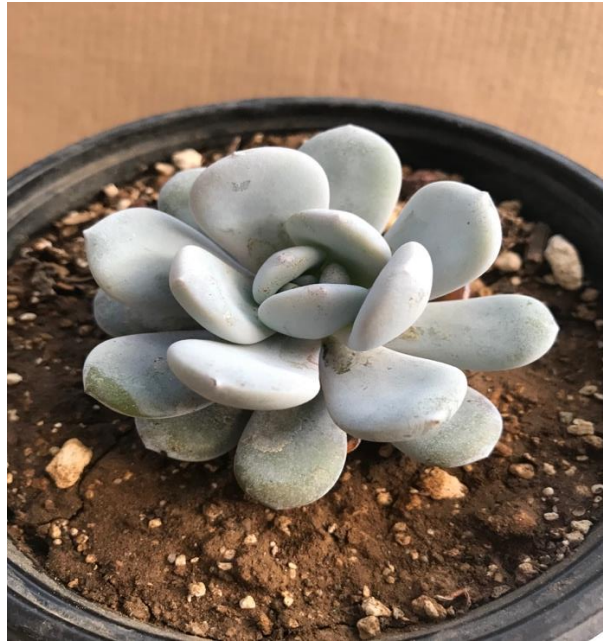


Figura 1. Ejemplar joven de *Echeveria laui* (fotografía tomada 26 de marzo, 2021).

3.3.2 Taxonomía

Reino	Plantae
Phylum o division	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Género	<i>Echeveria</i>
Especie	<i>laui</i>
Nombre científico	<i>Echeveria laui</i>
Determinadores	Moran, R. & Meyrán, J.

3.3.3 Descripción botánica

La especie *Echeveria laui* Moran, R. & Meyrán, J. es una planta glabra, marcadamente pruinosa, con roseta densa de 12-30 cm de diámetro, hojas obovadas, redondeadas, a obtusas, subapiculadas, bordes obtusos, de 5-8 cm de largo, 3-4.5 cm de ancho, 6-8 mm de grosor, rojizas o verde oscuro rojizo bajo la pruina. Presenta de uno a dos tallos florales 1-2, de 6-20 cm de longitud, con 5-7 hojas obovadas a elípticas, redondeadas a obtusas, espolonadas, de 11-20 mm de largo; la flor tiene sépalos ascendentes, algo incurvados, triangulares a elípticos-ovados, muy desiguales, el mayor de 16-20 mm de largo; la corola es piramidal de 13-16 mm de largo, 7-8 mm de diámetro en la base, roja pero muy pruinosa, y nectarios moteados de rojo. El número de cromosomas $n=15$. (Meyrán y López, 2003).

3.3.4 Ambiente

La especie habita en climas secos; en altitudes de 500 m. Normalmente crece en una de las cañadas laterales del río Salado-Quioytepec, en paredes casi verticales con exposición norte, en lugares secos (Moran y Meyrán, 1976; Meyrán y López, 2003). Su hábitat de vegetación de bosque tropical caducifolio se ha visto alterado por el saqueo de sus poblaciones. Es una especie endémica, rara, de distribución restringida. Florece durante febrero-abril.

3.3.5 Categorías y factores de riesgo

E. laui crece dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, área que cuenta con una superficie de 490,186-87-54.7 ha, administrada por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la SEMARNAT. La protección de *E. laui* está en función de la conservación del área natural protegida en su conjunto, ya que no existen proyectos o estrategias de conservación y de manejo específicos. Dentro de los factores de riesgo destacan que se trata de una especie endémica de distribución restringida, con

especificidad de hábitat. Alteración de hábitat por la colecta ilegal de plantas junto con otras especies con potencial ornamental.

3.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El término cultivo de tejidos vegetales involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales y consiste en regenerar plantas a partir de explantes o explantos bajo condiciones de luz y temperatura controlada, cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (Sharry *et al.*, 2015). El término “*in vitro*” hace referencia a cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial” (Castillo, 2010).

El cultivo de tejidos vegetales representa varias ventajas sobre los métodos de propagación tradicionales, dado que permite la masificación y preservación de especies que se encuentran en peligro de extinción o que presentan una carga genética importante (George *et al.*, 2008; Martínez-Villegas *et al.*, 2015).

3.4.1 Totipotencia celular

La totipotencia celular fue propuesta por Haberlandt en 1902, su teoría establecía que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas. Haberlandt no llegó a demostrar su hipótesis debido a que no pudo lograr la división celular. Los medios de cultivo que empleaba no incluían reguladores del crecimiento porque esos compuestos eran aún desconocidos. Los avances en cultivo de tejidos fueron muy lentos en sus inicios (Radice, 2004).

El cultivo *in vitro* se ha desarrollado debido a la totipotencia celular, que permite el desarrollo de una planta completa a partir de células somáticas. Esta técnica se basa en el cultivo de tejidos, órganos o células vegetales, en medios nutritivos adecuados, bajo condiciones asépticas y en ausencia de microorganismos, permitiendo el desarrollo de plantas completas a partir de explantes (Acosta, 2015; Alcántara-Cortes *et al.*, 2017).

3.4.2 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis es la formación de órganos y comprende procesos de desdiferenciación y rediferenciación celular, bajo determinados estímulos, para obtener diferentes respuestas como la regeneración de brotes, primordios de raíces, callos, entre otros (Pérez-Bernal *et al.*, 2008).

La respuesta morfogénica puede variar según el tipo de material vegetal, composición del medio y adición de reguladores de crecimiento debido a su relación directa con el explante (De Menezes *et al.*, 2016). Las condiciones endógenas del medio, deben permitir que los diferentes tejidos expresen distintas respuestas morfogénicas como organogénesis radicular, caulinar y embriogénesis, entre otras. (Prieto *et al.*, 2005).

3.4.3 Organogénesis *in vitro*

En la regeneración *in vitro* el desarrollo de la organogénesis es de gran importancia, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). La organogenesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes y receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014). Esto permite el desarrollo de meristemas, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur y Koncz, 2005).

Existen dos tipos de organogénesis: la directa y la indirecta. Se diferencian en que la primera se presenta sin la ocurrencia de un proceso prolongado de desdiferenciación, acompañado visiblemente de la formación de masas celulares indiferenciadas comúnmente denominadas callo, mientras que en la segunda existe notablemente formación de callo, previo a la formación de brotes (Acosta, 2012). La organogénesis indirecta a menudo induce la variación somaclonal y permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna

indeseable (Sala y Labra, 2003). El cultivo de tejidos *in vitro* vía organogénesis representa una alternativa para aumentar las tasas de multiplicación de vegetales y una herramienta para inducir cambios en la estructura genética (Schwarz *et al.*, 2005).

3.4.4 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene un embrión sin que medie la fertilización de los gametos. La producción de embriones puede realizarse a partir de una célula o de un grupo de células (Radice, 2004; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). El proceso de embriogénesis comienza con el cultivo de tejidos u órganos en medios inductores, generalmente adicionados con auxinas. De esta manera, se producen masas de tejido indiferenciado denominadas callos (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). No existe un protocolo aplicable a todas las especies y el procedimiento requiere el manejo de diferentes componentes y condiciones de cultivo que induzcan el desarrollo de los embriones. Una vez desarrollados, las plántulas son trasplantadas a sustratos específicos para ser aclimatadas (Radice, 2004; George *et al.*, 2008).

3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos *in vitro*

La determinación puede ser modificada por factores extrínsecos que pueden afectar la competencia celular y por consiguiente la capacidad de respuesta morfogénica. El desarrollo potencial de un tejido es restringido como consecuencia de la determinación. Los explantes de hoja pueden continuar su desarrollo cuando son cultivados en un medio simple que contiene reguladores de crecimiento, el tipo de desarrollo a seguir dependerá del estado fisiológico del primordio. La restricción persistirá en poblaciones de células que están en división (Christianson y Warnick, 1988; Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Igualmente, la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, afecta directamente los niveles hormonales endógenos y por lo tanto procesos esenciales para el desarrollo celular (Azcón-Bieto y Talón, 2001). De todos los factores implicados, los reguladores de crecimiento desempeñan un papel fundamental en el

control de la morfogénesis, los balances adecuados difieren de una especie a otras lo que hace que la regeneración de las plantas dependa tanto de los reguladores de crecimiento exógenos utilizados como las especies en los que se ensayan (Ammirato, 1986; Chaudhury y Rongda, 2000).

3.5.1 Genotipo

El efecto del genotipo ha sido un aspecto importante para la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, principalmente porque se parte un germoplasma élite para este propósito (Shahzad *et al.*, 2017).

El genotipo es un componente importante en los procesos morfogénicos ya que interviene desde la escisión del explante y su capacidad para responder al establecimiento del cultivo aséptico hasta la diferenciación de nuevos órganos. Existe una gran diversidad de respuestas morfogénicas *in vitro* de los diferentes genotipos a los requerimientos nutricionales y de reguladores del crecimiento. Es por ello que no es factible generalizar protocolos *in vitro*, estos deben ser desarrollados y adecuados para cada una de las especies estudiadas (Gubis, 2003; Cappelletti, 2016).

3.5.2 Explante

El explante es una parte de un tejido u órgano el cual es aislado de una planta (Litz y Jarret, 2004). La selección de un explante adecuado es el primer paso para el establecimiento de cultivos *in vitro*, esta elección se hace de acuerdo con el objetivo a estudiar y la especie vegetal involucrada (Cardoza, 2005).

Si la selección del explante no limita el cultivo de tejidos en cuanto a la generación de callos o de brotes, la selección se basa en la disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad y la rápida respuesta *in vitro*. Los explantes pueden ser tomados de las plantas que son germinadas en invernadero, en campo o en condiciones *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993). Se ha observado que el uso de material vegetal adulto ha dificultado el

cultivo *in vitro* más que cuando se trabaja con material juvenil (material revigorizado, semillas, embriones o explantes de árboles jóvenes) ya que estos tienen grado de actividad meristemática por lo tanto tienden a tener mayor plasticidad *in vitro* (Yildiz, 2012).

Los explantes pueden ser cualquier parte de la planta desde una célula a un órgano, sin embargo, explantes como la raíz e hipocótilos son materiales excelentes para la iniciación de callo y regeneración, en contraste con tallos y hojas (Mathur y Koncz, 2005).

3.5.3 Medio de cultivo

Los medios de cultivo artificiales involucran nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de una planta. Se componen de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas. El medio de cultivo provee compuestos orgánicos e inorgánicos, particularmente contiene concentraciones altas de NO_3 y NH_4 (Thorpe, 2014), se adiciona con sacarosa como fuente de carbono; para su solidificación se utiliza agar o phytigel. Normalmente está contenido en recipientes de vidrio para ser esterilizado. Los medios de cultivo se complementan con fuentes de carbono (azúcares) como fuentes de energía. Esta adición reduce considerablemente el potencial hídrico del medio y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana y fúngica. A las plantas normalmente se les suministra reguladores de crecimiento. Estas condiciones dan como resultado la formación de plántulas de morfología, anatomía y fisiología diferente a la que representa en la naturaleza (Kozai y Smith, 1995).

La mayoría de los medios son ajustados a un pH de 5.2 a 5.8. Los pH fuera de estos límites parecen no afectar los tejidos vegetales, pero retrasa el crecimiento de contaminantes potenciales. Sin embargo, pH altos son requeridos para ciertos cultivos (Cardoza, 2005).

3.5.4 Reguladores del crecimiento vegetal

El medio de cultivo también puede estar adicionado con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) que son incorporados en bajas concentraciones, regulando el desarrollo (crecimiento y diferenciación) y nutrición de las plantas. Estos compuestos juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y tejidos en medios de cultivo. Las auxinas, las citocininas y las giberelinas son de gran importancia en el cultivo *in vitro*; sin embargo, el tipo y la concentración dependerán principalmente de la especie, el tejido u órgano y el objetivo del estudio (Saad y Elshahed, 2012).

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de desarrollo (crecimiento y diferenciación) de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 μM . A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, no conviene generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross, 2000).

3.5.5 Auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA) (Ludwig-Müller y Cohen, 2002).

Grandes cantidades de auxinas se encuentran relacionadas con procesos activos de división celular, debido a que sus funciones biológicas están asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, tropismos y promoción de la dominancia apical (Cruz *et al.*, 2010)

El AIA es la auxina natural más importante, su uso en cultivo *in vitro* es reducido por ser inestable al calor y la luz, por lo que algunas veces es combinado con otros aminoácidos como la alanina y la glicina (Smith, 2012).

3.5.6 Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas se encuentran: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-IP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury y Ross, 2000).

Las citocininas regulan el crecimiento de brotes y raíces. Controlan la tasa de diferenciación celular durante el desarrollo del meristemo radicular, suprimiendo el transporte y señalización de las auxinas. En el cultivo *in vitro* se utilizan para promover la formación de brotes y embriones, en combinación con auxinas, estimulan la división celular y controlan la morfogénesis (George *et al.*, 2008).

En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995). Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson y Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tidiazuron (TDZ), la N, N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU).

3.5.7 Giberelinas

Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes: 1) estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, 2) promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y 3) incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury y Ross, 2000). Inducen la germinación en semillas en condiciones de dormancia (Peng y Harberd, 2002).

3.5.8 Fuente de carbono y suplementos no definidos

Muy pocas células en el cultivo *in vitro* son autótrofas, por lo tanto, la provisión de una fuente exógena de carbono es de gran importancia. La fuente de carbono más común es la sacarosa, debido a que es económica, se encuentra fácil, es asimilable y relativamente estable. La glucosa a veces es usada en reemplazo de la sacarosa, y puede proveer iguales o mayores efectos en el crecimiento de los cultivos. Otras fuentes son la maltosa, la galactosa y el sorbitol (Litz y Jarret, 2004).

Normalmente la adición de auxinas y citocininas se emplean para regular el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de los tejidos vegetales. No obstante, el uso de estos compuestos es costoso, por tanto, se han investigado sustitutos de origen natural que puedan ser una fuente de minerales, aminoácidos, vitaminas y azúcares (Vyas *et al.*, 2009).

Los aditivos orgánicos que se complementan en medio de cultivo podrían promover el desarrollo en algunas especies de plantas (Yong *et al.*, 2009; Molnar *et al.*, 2011). Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos y

otros. Entre ellos están el agua de coco (5% a 15%, v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, y el extracto de tubérculos de papa (Roca y Mroginski, 1993). También es posible encontrar reportes donde se indica el reemplazo de la sacarosa, las vitaminas y los micronutrientes, por la melaza de caña de azúcar (Góes *et al.*, 2009).

Además de glicina, en ocasiones se incorporan al medio de cultivo otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios y en concentraciones relativamente altas pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos (Roca y Mroginski, 1993).

3.5.9 Antioxidantes y absorbentes

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascorbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles (Roca y Mroginski, 1993).

El carbón activado (0.1% a 5%) incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos (Roca y Mroginski, 1993).

3.6 Cultivo *in vitro* de crasuláceas

La familia *Crassulaceae* es reconocida por tener una gran variedad de géneros y especies, las cuales son buscadas, colectadas y propagadas por su belleza con fines ornamentales. México es considerado como una zona de origen de muchas especies pertenecientes a esta familia. Por ejemplo, la siempreviva (*Sedum praealtum* A.DC)

pertenece a la familia Crassulaceae, y frecuentemente se encuentra en huertos familiares por su empleo como ornato y medicinal (Estrada *et al.*, 2008).

El género *Kalanchoe* consta de unas 130 especies de especies anuales, arbustos perennes, trepadores y arbolitos. Suelen aparecer en semi desierto o con sombra, además de su valor ornamental, *Kalanchoe* también es muy conocida como planta medicinal y muy famosa por su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética, antiesfina y antitumoral (Akinpelu, 2000; Tadeg *et al.*, 2005).

Se ha observado que cada especie vegetal puede responder de manera diferente a las condiciones y a los reguladores de crecimiento usados en el cultivo *in vitro*, por lo que es necesario trabajar en cada una de ellas para encontrar condiciones de regeneración óptimas (Retes *et al.*, 2007).

3.6.1 Medios de cultivo

Dentro de la familia Crassulaceae se han publicado algunos estudios sobre la propagación *in vitro*.

En *Echeveria elegans*, una especie mexicana en peligro de extinción, la propagación *in vitro* a partir de brotes axilares se evaluó como una alternativa de multiplicación y preservación utilizando una combinación de 6-Bencil Aminopurina (6-BAP) con Ácido Naftalen Acético (ANA) en diferentes concentraciones. Se obtuvo un máximo de 4.21 brotes promedio por explante con 6.66 μM de 6-BAP + 1.35 μM de ANA a los 40 días de su establecimiento (Solis *et al.*, 2013).

- “*In vitro* propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture”. El objetivo de este trabajo fue establecer la propagación *in vitro* a partir de brotes axilares. Se encontró que con el medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de AG₃ se generaron 15 brotes axilares por explante. Además, con el medio MS al 50% de sales inorgánicas y suplementado con 50 g

L⁻¹ de sacarosa se mejoró el alargamiento de los brotes y aumentó el contenido total de clorofila. En los explantes de yema axilar que se cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento se observó un mayor número de raíces (17.7 por explante) (Bae *et al.*, 2012)

- “*Obtención in vitro de plantas de Echeveria pumila cv. 'Glauca' libres de bacterias y fitoplasmas asociados a la fasciación del tallo*”. El objetivo del trabajo fue propagar esta planta para obtener material vegetal y desarrollar una metodología para eliminar patógenos. Se utilizó el medio MS adicionado con 0.2 mg L⁻¹ de BAP y 0.02 mg L⁻¹ de ANA y se obtuvieron 3.6 brotes por explante y con Thidiazuron (0.6 mg L⁻¹) 2.5 brotes por explante libres de bacterias y fitoplasmas. (Bulbarela, 2014).
- “*Comparación de la tasa de propagación in vitro y ex vitro de la especie endémica de Michoacán, Echeveria purhepecha*”. El objetivo fue propagar *in vitro* y *ex vitro* la especie y comparar los resultados obtenidos de las tasas de propagación. *E. purhepecha* se considera una especie en posible situación de vulnerabilidad ocasionada, principalmente, por el cambio de uso de suelo en su hábitat natural. La tasa de propagación bajo condiciones de cultivo *in vitro* con 4 mg L⁻¹ de 6-bencil aminopurina (BAP) y 0.2 mg L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) a partir de hoja y tallo como explantes fue 1.6 veces mayor respecto a la de propagación *ex vitro* (Ayala-González y Obledo-Vázquez, 2015).
- Establecimiento de cultivo de tejidos *in vitro* y método de aclimatación para propagación masiva de *Echeveria laui* y *Echveria elegans*. El objetivo de este estudio fue determinar las partes de la planta más adecuadas para la inducción de callos. Se utilizaron hojas divididas en parte superior, media e inferior y se colocaron en medio de cultivo MS adicionado con 0-2 mg L⁻¹ de ácido indolacético (ANA) y 0-4 mg L⁻¹ de BAP. Los mejores resultados se obtuvieron con explantes de hoja superior y media, ya que, la formación de callo fue de 100% con 1 mg L⁻¹ de ANA y 1 mg L⁻¹ de BAP en *E. laui*. Por el contrario, la parte media de la hoja de *E. elegans* formó 83.3% de callos adicionando 2 mg L⁻¹ de ANA y 4 mg L⁻¹ de BAP (Kim *et al.*, 2019).

3.6.2 Tipos de explantes utilizados *in vitro*

Wojciechowiez (2007) analizó el potencial de regeneración de diferentes explantes de yemas florales (pétalos, estambres y pistilos) en *Sedum acre*, *S. aizoon*, *S. floriferum*, *S. grácil*, y *S. spectabile*. En cambio, Kitamura *et al.* (2002) trabajaron con tallos y hojas de *Sedum drymaroides*, logrando propagar esta especie por organogénesis indirecta. Su-Juan *et al.* (2009), por la misma vía, establecieron un protocolo de propagación de *Sedum alfredii* utilizando hojas como explantes. Yang *et al.* (2012) lograron propagar *Sedum spectabile* cultivando la parte basal de las hojas.

Mohaddeseh *et al.* (2013) utilizaron para *Kalanchoe blossfeldiana* micro cortes de yemas apicales aislados de una planta madre para ser utilizados como explantes. Por otro lado, a partir de plántulas de 3-4 cm de longitud obtenidas *in vitro* de *Echeveria elegans* se obtuvieron segmentos de 1.5 cm sin el meristemo apical, y cada explante con aproximadamente 4 brotes axilares (Solís *et al.*, 2013).

Kertrung y Junkasiraporn (2018) obtuvieron los mejores resultados utilizando explantes de *Kalanchoe hombopilosa* de tallos, los cuales mostraron un alto porcentaje de regeneración de brotes al sembrarlos tanto horizontal (94.4%) como verticalmente (72.2%). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en *Kalanchoe blossfeldiana*, donde se utilizaron explantes de hojas y entrenudos (Sanikhani *et al.*, 2006).

En estudios más recientes, específicamente en *Echeveria gibbiflora* “*Helena*” se utilizó el tallo floral como explante, basándose en que, en algunas especies, la poda del tallo floral antes de la apertura de las flores, favorece la generación de brotes ya que este puede llegar a medir más de 1.5 metros de alto, así mismo, se utilizaron hojas de rosetas. En los resultados se observó que mantener las hojas de la roseta mientras se eliminan las brácteas en los tallos florales, favorece un mayor número de brotes vegetativos (Salomé-Castañeda *et al.*, 2019).

3.6.3 Reguladores del crecimiento

Se han utilizado diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de Crassulaceas. En *Sedum spectabile* la inducción de brotes más alta obtenida con la base de la hoja como explante fue de 88.9% en medio MS suplementado con 0.6 mg L⁻¹ de thidiazuron (TDZ) y 0.1 mg L⁻¹ de ANA (Yang *et al.*, 2012).

En *Echeveria pumila* la tasa de multiplicación más alta que se logró fue de 13 brotes por explante en el medio adicionado con 2 mg L⁻¹ de BAP más 0.2 mg L⁻¹ de ANA. (Arellano-Ostoa *et al.*, 2020).

En la regeneración *in vitro* de *Kalanchoe tomentosa*, una valiosa planta medicinal y ornamental, se evaluaron diferentes dosis de BAP y ANA, sin embargo, el número máximo de brotes se obtuvo en medio MS libre de hormonas. Esto podría deberse al hecho de que *Kalanchoe tomentosa* produce endógenamente cantidades suficientes de citocininas y auxinas (Khan *et al.*, 2006).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Genética, ubicado en el edificio “Dr. José D. Molina Galán” (Genética) del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

4.1 Material vegetal

El material biológico empleado fueron semillas de *Echeveria laui* Moran & Meyrán, (Figura 2) de 3 y 5 meses de edad, mismas que fueron proporcionadas por el Sr. Francisco Javier Gómez Coquis de la delegación Xochimilco, Ciudad de México, México.

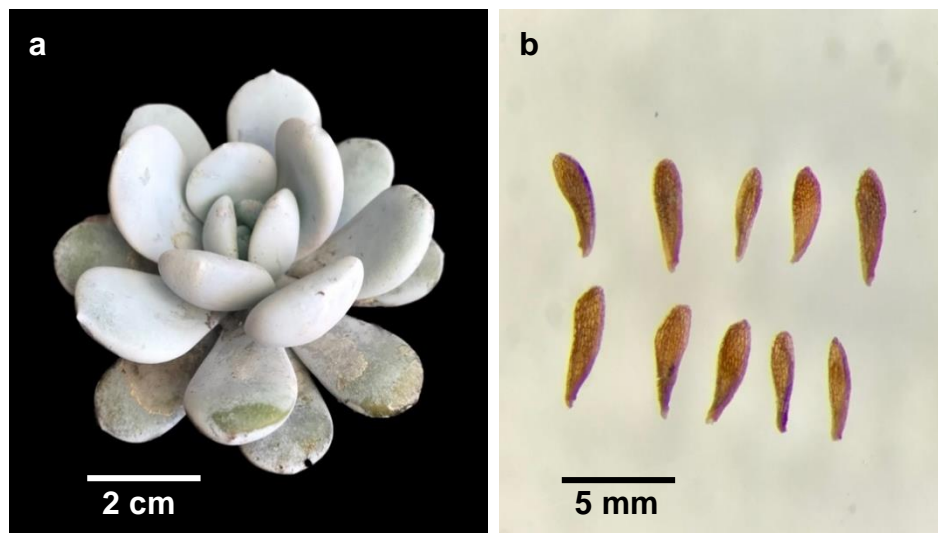


Figura 2. *Echeveria laui*. (a) Ejemplar adulto; (b) semillas.

4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado en todos los experimentos estuvo constituido por las sales minerales del medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) (Apéndice 1) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), ácido nicotico (0.5 mg L^{-1}), HCl-piridoxina (0.5 mg L^{-1}), HCl-tiamina (0.1 mg L^{-1}), glicina (2.0 mg L^{-1}) y solidificado con agar-agar

(MP Biomedicals, LLC®, 11 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se llevó a cabo en autoclave vertical (AESAs® 300) A 121°C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los cultivos se incubaron a 26 ± 2°C en condiciones de fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻² s⁻¹ proporcionada por luz blanca fría de lámparas LED.

4.3 Cultivo aséptico y germinación *in vitro*

Para establecer el cultivo aséptico se partió de un lote de semillas de 5 meses de edad y se seleccionaron 250 semillas, sanas y de tamaño uniforme. La desinfección superficial se hizo en condiciones asépticas y se evaluaron cinco tratamientos constituidos por:

- 1) plata coloidal 3% v/v (Microdyn®, 0.35% de ingrediente activo)
- 2) Tween® 20 (0.5 % v/v)
- 3) hipoclorito de sodio comercial al 20% v/v (NaOCl, Cloralex®, 6% de cloro activo)
- 4) etanol al 20%
- 5) agua destilada estéril

Las semillas se sumergieron por 10 min en agitación continua en cada tratamiento y al finalizar se sembraron en grupos de 10 en frascos de cultivo de vidrio de 100 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo básico MS con la mitad de concentración de sales.

4.3.1 Variables cuantificadas

Durante diez semanas, cada dos días, se evaluó la contaminación por bacterias (%), contaminación por hongos (%), supervivencia (%) y germinación (%).

4.4 Viabilidad de semillas

Se seleccionaron 200 semillas sanas de 3 meses de edad de tamaño uniforme. La desinfección superficial se hizo en condiciones asépticas, las semillas se sumergieron en una solución de plata coloidal estable 3% v/v (Microdyn®, 0.35% de ingrediente activo) más 1.5 mL L⁻¹ de Tween® 20 como agente surfactante al 1% y se mantuvo en agitación durante 4 min. Posteriormente, y sin enjuagar la solución desinfectante, con una aguja de disección se colocó 1 semilla por frasco de cultivo de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo básico MS con la mitad de concentración de sales y adicionado con 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃).

4.4.1 Variables cuantificadas

Después de seis semanas se cuantificó el porcentaje de germinación acumulada (%)

4.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 200 repeticiones donde la unidad experimental fue de una semilla por frasco de cultivo. Con los datos obtenidos se hizo un análisis cualitativo.

4.5 Regeneración *in vitro* de plantas por organogénesis directa

4.5.1 Inducción de brotes

Para inducir la organogénesis se utilizaron como explantes hojas de 1 a 2 cm de longitud de plántulas germinadas *in vitro* de 12 semanas de edad con al menos 10 hojas formadas. Los explantes se establecieron en frascos de cultivo de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio básico MS adicionado con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 1). Para observar y cuantificar las respuestas morfogénicas

promovidas por los reguladores de crecimiento, de acuerdo con el tiempo de exposición, los explantes de cada tratamiento se subcultivaron al mismo medio cada 30 días durante 90 días.

Cuadro 1. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la inducción de brotes de *Echeveria laui* a partir de hojas de plántulas *in vitro*.

Tratamiento (Núm.)	BAP		AIA		ANA	
	mg L ⁻¹	µM	mg L ⁻¹	µM	mg L ⁻¹	µM
1 (Testigo)	0	0	0	0	0	0
2	1.9	8.8	0	0	0	0
3	2.4	11.1	0	0	0	0
4	2.9	13.2	0	0	0	0
5	3.4	15.5	0	0	0	0
6	0	0	0.2	1.0	0	0
7	0	0	0	0	0.3	1.7
8	1.9	8.8	0.2	1.0	0	0
9	2.4	11.1	0.2	1.0	0	0
10	2.9	13.2	0.2	1.0	0	0
11	3.4	15.5	0.2	1.0	0	0
12	1.9	8.8	0	0	0.3	1.7
13	2.4	11.1	0	0	0.3	1.7
14	2.9	13.2	0	0	0.3	1.7
15	3.4	15.5	0	0	0.3	1.7
16	1.9	8.8	0.2	1.0	0.3	1.7
17	2.4	11.1	0.2	1.0	0.3	1.7
18	2.9	13.2	0.2	1.0	0.3	1.7
19	3.4	15.5	0.2	1.0	0.3	1.7

4.5.1.1 Variables cuantificadas

Cada semana, durante 12 semanas, se contabilizó la brotación (B, %; calculada por el número de explantes que formaron brotes) y número de brotes por explante (BE).

4.5.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con un explante. Para el análisis estadístico se hizo un ANDEVA con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.5.2 Multiplicación de brotes

Explantos de hoja de 1 a 2 cm de longitud se cultivaron en frascos de cultivo de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio básico MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP y un testigo sin reguladores de crecimiento. A cada dosis de BAP se agregó 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la multiplicación de brotes de *Echeveria laui*.

Tratamiento (Núm.)	BAP		AIA		ANA	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1 (Testigo)	0	0	0	0	0	0
2	1.4	6.6	0.2	1.0	0.3	1.7
3	1.9	8.8	0.2	1.0	0.3	1.7
4	2.4	11.1	0.2	1.0	0.3	1.7
5	2.9	13.2	0.2	1.0	0.3	1.7
6	3.4	15.5	0.2	1.0	0.3	1.7

4.5.2.1 Variables cuantificadas

Cada semana, durante un periodo de 12 semanas, se contabilizó el número de brotes por explante, callogénesis (% del número de explantes que generaron callos) y brotación (% del número de explantes que formaron brotes).

4.5.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con un explante. Para el análisis estadístico se aplicó un ANDEVA con el software SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.5.3 Enraizamiento de brotes

Brotes *in vitro* con 6 hojas formadas se establecieron en frascos de cultivo de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ácido naftalenacético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) evaluadas en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Echeveria Laui*.

Tratamiento (Núm.)	ANA		AIB	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1 (Testigo)	0	0	0	0
2	1	5.2	0	0
3	2	10.6	0	0
4	0	0	0.9	4.5
5	0	0	1.8	9.1

4.5.3.1 Variables cuantificadas

A las seis semanas se cuantificó el enraizamiento (%), calculado por el número de brotes que formaron raíces) y número de raíces por brote (RB).

4.5.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con un brote. A los datos se aplicó un ANDEVA con el software estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.5.4 Aclimatación de plántulas

En esta etapa se evaluaron plantulas enraizadas *in vitro* con 10 hojas formadas. Las plantulas se extrajeron de los frascos de cultivo de vidrio y se lavaron con agua destilada tibia para retirar el medio de cultivo de las raíces. A continuación, se plantaron en vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad con cuatro tipos de sustrato: peat moss + agrolita (1:1), peat moss + tezontle (1:1), peat moss + tezontle + agrolita (1:1:1) y tezontle. Después se aplicó riego con 50% de la concentración de sales del medio básico MS. Al finalizar el trasplante, las plantas se cubrieron con vasos de poliestireno cristal (GPPS) de 9x15 cm (diámetro/alto) sellados con un domo del mismo material.

Las plantas se colocaron a temperatura ambiente promedio de 23 ± 3 °C con fotoperiodo de 12 h. Durante las dos primeras semanas se regaron con 50% de la concentración de sales del medio básico MS y al final de este periodo se hicieron cuatro perforaciones al domo para favorecer la circulación del aire. Posteriormente se regaron con agua corriente de grifo y se retiraron los domos a las ocho semanas después del trasplante.

4.5.4.1 Variables cuantificadas

Después de 12 semanas se cuantificó el porcentaje de supervivencia (%), número de hojas (NH), longitud de raíz (LR, cm).

4.5.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo de vidrio con una plantula. A los datos se aplicó un análisis de varianza con el software estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.6. Resumen de metodología para la regeneración *in vitro* de *Echeveria laui*

En resumen, la presente investigación comprendió varios aspectos, abordando desde la germinación de semillas en condiciones asépticas, la regeneración *in vitro* por organogénesis directa hasta la aclimatación de las plántulas multiplicadas bajo condiciones *in vitro* de *Echeveria laui*. Todo el proceso de la metodología implementada para determinar la morfogénesis (regeneración por organogénesis directa) *in vitro* de *Echeveria laui* se sintetiza en un diagrama de flujo (Figura 3).

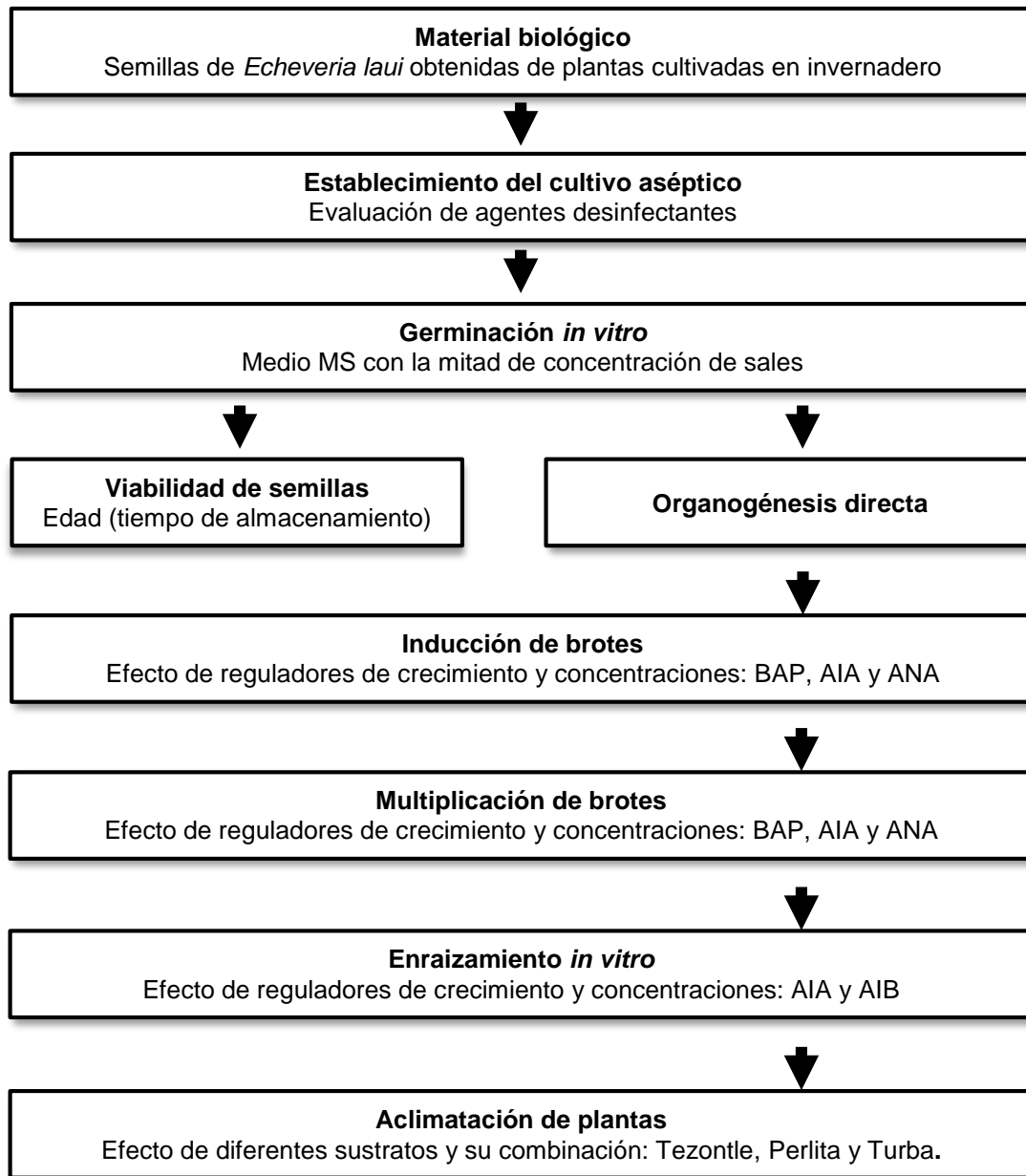


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología evaluada para la regeneración *in vitro* de *Echeveria laui*.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Los mejores tratamientos de desinfección fueron los constituidos por hipoclorito de sodio (NaOCl, Cloralex®, 6% de cloro activo) al 20%, plata coloidal (Microdyn®) al 1.5% y Tween 20® al 0.5%. Con cada una de las sustancias evaluadas se obtuvo 100% semillas libres de microorganismos contaminantes (Cuadro 4). Estos resultados coinciden con los obtenidos en semillas de *Echinocactus platyacanthus* donde se obtuvo 100% de semillas libres de contaminación al utilizar plata coloidal por 15 min, alcohol etílico al 70% por 2 min y blanqueador doméstico al 30% (v/v) por 30 min (López-Escamilla *et al.*, 2016). Sin embargo, para las semillas de las especies de cactáceas *Mamillaria albinata*, *M. bocasana*, *M. columbina*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima* resultó eficiente hacer una serie de lavados con detergente comercial en polvo (Ariel ©) y Tween20®; inmersión en etanol al 70% durante 5 min; inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 min y finalizar con dos lavados consecutivos de agua estéril, no se presentó contaminación (Ramírez-González *et al.*, 2019). Para el cultivo *in vitro* de la especie silvestre *Pentacalia nitida* se obtuvo 90% de desinfección de semillas al colocarlas en una solución de Tween20® durante 15 min y posteriormente enjuagar con agua microfiltrada estéril y finalizar la desinfección con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 6.0% con dos gotas de Tween20® durante 5 min (Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón, 2017).

El tratamiento con etanol al 20% durante 10 min no logró eliminar completamente la presencia de microorganismos, al registrarse 20% de contaminación por hongos durante las dos primeras semanas de cultivo. También se observó que dosis bajas de hipoclorito de sodio no resultan efectivas para la desinfección de semillas de *E. laui*.

Cuadro 4. Desinfección superficial de semillas de *Echeveria laui* con diferentes agentes.

Método de desinfección	Semillas libres de contaminación
agua destilada estéril	0%
20% de NaOCl + 10 min	100%
20% de Etanol + 10 min	80%
1.5% de Plata coloidal + 10 min	100%
0.5% de Tween 20® + 10 min	100%

El tratamiento de desinfección con agua destilada estéril no fue suficiente para evitar la contaminación; en la primera semana de cultivo la contaminación de los explantes fue de 100%. Esta respuesta indica que para lograr el establecimiento del material vegetal de manera exitosa y libre de contaminantes se deben utilizar agentes desinfectantes más eficientes como el hipoclorito de sodio (NaOCl) o el etanol C₂H₅OH. En algunos casos también resulta útil agregar algún agente tensoactivo como Tween20® (Roca y Mroginski, 1993).

5.2 Germinación *in vitro*

La evaluación de la germinación *in vitro* de las semillas se hizo de manera simultánea con los tratamientos de desinfección debido a que la cantidad de semillas fue limitada para el estudio. Las semillas de cinco meses de almacenamiento de *Echeveria laui* cultivadas en medio MS (1962) con 50% de concentración de sales mostraron una respuesta positiva en la germinación *in vitro* (Figura 4).

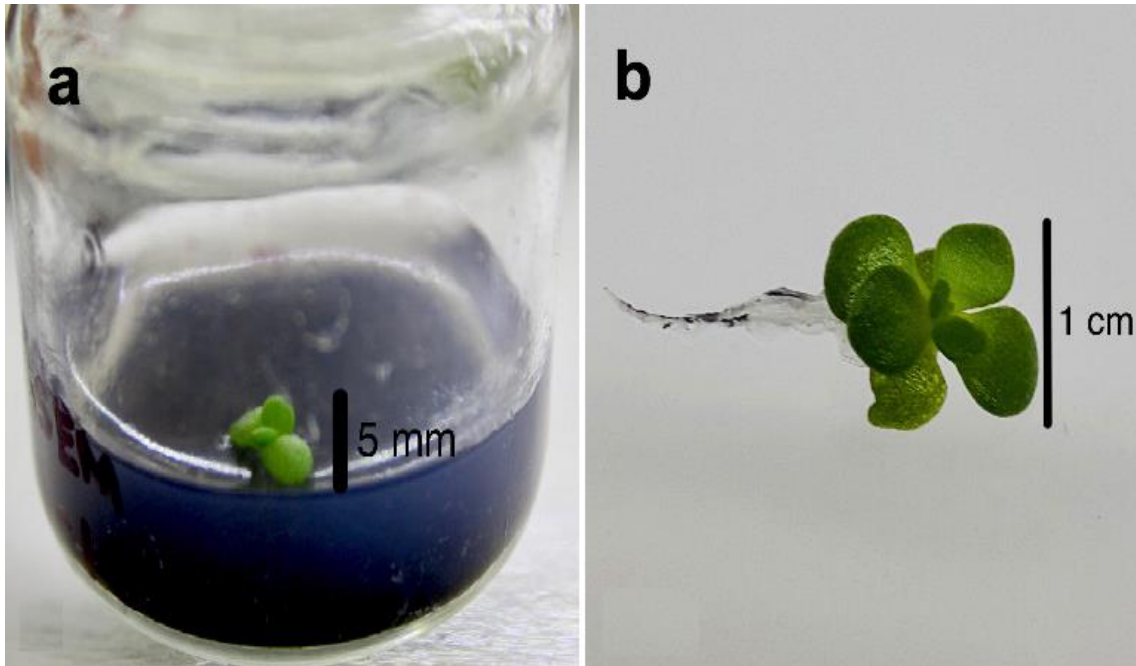


Figura 4. Germinación *in vitro* de plantas de *Echeveria laui*. a) Plántula de cuatro semanas de cultivo; b) Plántula de ocho semanas de cultivo.

Se obtuvo 44% de germinación con semillas de cinco meses de edad cuando se desinfectaron con Tween 20®. Este porcentaje puede considerarse aceptable ya que Piña-Poujol *et al.* (2007) solo obtuvieron 10% de germinación en condiciones *ex vitro* con semillas de seis meses de almacenamiento.

En el caso de las semillas desinfectadas con plata coloidal (Microdyn®) la germinación fue de 40%. Davies y Etris (1997) mencionan que la plata coloidal puede ser un tratamiento eficaz para el control de organismos patógenos debido a las reacciones bioquímicas que resultan en la inactivación de hongos, bacterias, espiroquetas, protozoos, entre otros, que no están protegidos por membranas proteicas. Este agente resulta efectivo al cumplir con la desinfección del explante y no causar daños en la semilla.

Otro de los agentes desinfectantes empleados en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es el etanol. Su uso en bajas concentraciones y tiempos de exposición cortos (minutos)

puede ser efectivo en la desinfección de explantes como lo reportado por Jiménez *et al.*, (2017) en *Cedrela odorata*. En dicha investigación 95.6% de los explantes tratados con etanol 50% por 5 min resultaron libres de contaminación. Sin embargo, en el presente estudio el tratamiento de desinfección de las semillas con alcohol 70% solo permitió la germinación de 12%. Por esta respuesta este agente desinfectante puede considerarse nocivo para el embrión de *E. laui*. En *Kalanchoë pinnata*, Chiquete-Carrillo *et al.* (2016) obtuvieron 100% de desinfección de explantes al usar etanol al 20% pero al igual que en la presente investigación el uso de esta sustancia causó daños significativos en el explante.

El hipoclorito de sodio al 20% de concentración redujo significativamente la presencia de microorganismos contaminantes. Sin embargo, es probable que haya causado un daño al embrión debido a que solo el 12% de las semillas germinó.

5.3 Viabilidad de semillas

Para determinar la capacidad de germinación de las semillas de *E. laui* en almacenamiento se sembraron 200 semillas sanas de tres meses. Se obtuvo 15% de germinación *in vitro* en medio de cultivo básico MS adicionado con 2.0 mg L⁻¹ de AG₃. Rojas-Aréchiga *et al.* (1998) estipulan que la baja germinación puede ser resultado de los diversos mecanismos fisiológicos que desarrollan las especies suculentas para poder persistir en ambientes desérticos. A reserva de un estudio amplio sobre la ecología de las semillas de *E. laui*, este bajo porcentaje de germinación podría estar relacionado con un proceso de dormición de las semillas. Aquí el embrión permanece en estado latente hasta que las condiciones ambientales sean propicias para la germinación.

Rodríguez-Rojas *et al.* (2016) señalan que la baja cantidad de semillas viables en diversas especies de *Echeveria* posiblemente podría deberse a la escasa cantidad de polen depositado en los estigmas. Parra-Tabla *et al.* (1998) indican que el cuajado de frutos y semillas puede disminuir por efecto de la disponibilidad de polen, sobre todo cuando la polinización es manual. Jimeno-Sevilla *et al.* (2014) reportan que el cuajado

de frutos en *Echeveria rosea* es mayor en condiciones naturales que en condiciones controladas. Rodríguez-Rojas *et al.* (2016) sugieren que en condiciones de invernadero no es posible la autofecundación en especies de *E. runyonii* y *E. perle*. El material utilizado en la presente investigación fue resultado de plantas cultivadas dentro de invernadero, por lo que la baja viabilidad de las semillas podría deberse a un proceso de polinización incorrecto para la especie en estudio.

5.4 Regeneración *in vitro* de plantas por organogénesis directa

5.4.1 Inducción de brotes

La ruta de regeneración *in vitro* más utilizada en la mayoría de las crasuláceas es la inducción de brotes por organogénesis directa (Wojciechwich, 2007; Ahmed y Taha, 2014; Kumari, 2016; Liu *et al.*, 2016). En la presente investigación la utilización de reguladores de crecimiento afectó significativamente la brotación y el número de brotes por explante. El tratamiento compuesto por 11.1 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA resultó el mejor, ya que promovió la inducción de 1.8 brotes por explante después de 15 semanas de cultivo (Figura 5a). En contraste, con el testigo sin reguladores de crecimiento donde sólo se produjeron 0.7 brotes.

Después de 15 semanas de cultivo no se registró la formación de nuevos brotes, en cambio, se observó la formación de callo tipo friable de color verde claro en 40% de los explantes con y sin reguladores de crecimiento (Figura 5b).

La relación entre auxinas y citocininas es un factor de suma importancia, debido a que actúa en la regulación del desarrollo (crecimiento y diferenciación) de los brotes (Aremu *et al.*, 2016). Casanova *et al.* (2019) reportaron que el establecimiento *in vitro* de *Monstera acuminata* y *Monstera deliciosa* en medio MS con 1.0 μM de BAP, 2.5 μM de AIA y 0.6 μM de ANA favoreció la organogénesis a partir de discos de tallo. Estas concentraciones indujeron 7 brotes por explante y en todos los explantes se formaron callos.

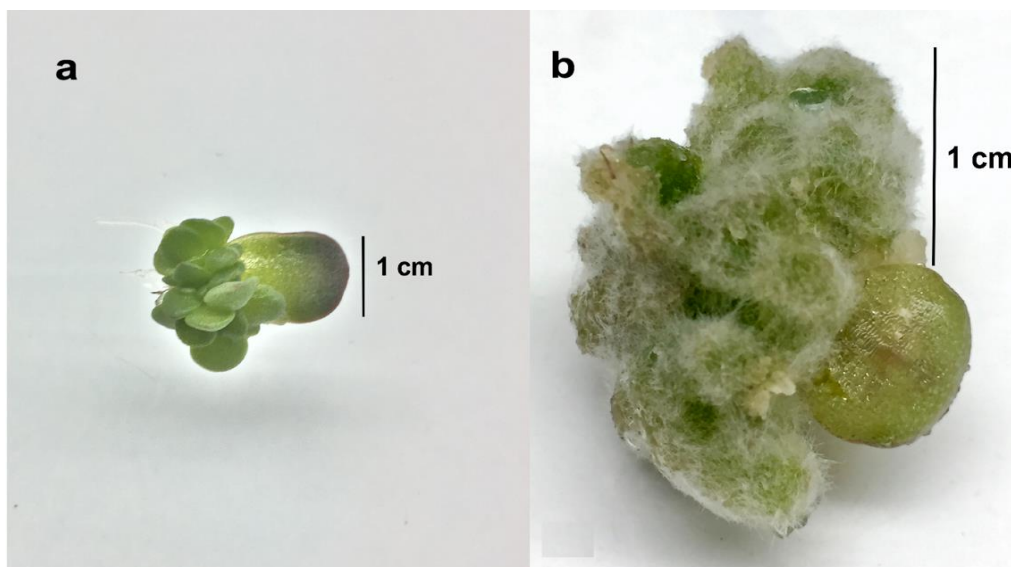


Figura 5. Inducción de brotes a partir de hoja de *Echeveria laui*. a) Brotes cultivados en medio MS con 11.1 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA; b) Callo friable inducido en explante de hoja en medio MS con 3.4 μM de BAP y 1.7 μM de AIA.

En el presente estudio, el mayor porcentaje de formación de callo se observó en el tratamiento con 15.5 μM de BAP y 1.0 μM de AIA, donde se obtuvo 87% de callos y un promedio de 0.3 brotes por explante (Cuadro 5).

Cuadro 5. Brotación (B, %) y número de brotes por explante (BE) inducidos a partir de hojas de *Echeveria laui* con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftanelacético (ANA) a las cinco, diez y doce semanas de cultivo.

BAP + AIA+ANA (μM)	5 semanas		10 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
0 +0 +0	13 ab	0.1 a	33 bcdef	0.4 bc	47 a	0.67 bcd
8.8 +0 +0	0 b	0 a	0 f	0.0 d	27 a	0.33 çcd
11.1 +0 +0	0 b	0 a	20 cdef	0.2 cd	47 a	0.53 bcd
13.2 +0 +0	0 b	0 a	13 def	0.1 cd	53 a	0.6 bcd
15.5 +0 +0	7 ab	0.1 a	60 abcd	0.7 abcd	53 a	0.73 abcd
0+1.0+0	0 b	0 a	33 abcdef	0.4 bcd	53 a	0.8 abcd
0 + 0 + 1.7	7 ab	0.1 a	40 abcdef	0.4 bcd	60 a	0.67 bcd
8.8 + 1.0 +0	7 ab	0.1 a	7 ef	0.1 cd	20 a	0.27 bcd
11.1 + 1.0 +0	13 ab	0.2 a	60 abcdef	0.6 abcd	33 a	1.2 abcd
13.2 + 1.0 +0	0 b	0 a	13 def	0.1 cd	33 a	0.33 cd
15.5 + 1.0 +0	0 b	0 a	13 def	0.1 cd	27 a	0.33 cd
1.9 +0 + 1.7	0 b	0 a	0 f	0.0 d	33 a	0.4 cd
2.4 + 0 + 1.7	13 ab	0.1 a	33 abcdef	0.3 cd	47 a	0.8 abcd
2.9 + 0 + 1.7	0 b	0 a	13 def	0.1 cd	53 a	0.67 bcd
3.4 + 0 + 1.7	13 ab	0.1 a	20 ecdef	0.2 cd	33 a	0.33 cd
1.9 + 1.0 + 1.7	40 a	0.4 a	80 a	1.1 abcd	80 a	1.6 ab
2.4 + 1.0 + 1.7	4 a	0.4 a	73 ab	1.3 abcd	73 a	1.8 a
2.9 + 1.0 + 1.7	27 ab	0.3 a	67 abc	0.7 abcd	73 a	1.4 abc
3.4 +1.0 +1.7	33 ab	0.3 a	60 abcd	0.7 abcd	60 a	1.4 abc

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch (2007) mencionan que la BAP tiene efectos no deseables en las cactáceas cultivadas de manera *in vitro*, ya que suele estimular una excesiva producción de callos. Así mismo, Bravo-Ávila *et al.* (2016) indican que concentraciones altas de BAP en explantes de hoja de *Sedum praealtum* tienen un efecto limitante en la producción de brotes y que esto puede deberse a la producción endógena de auxinas.

5.4.2 Multiplicación de brotes

En la fase de multiplicación se usaron diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas y citocininas. La mejor combinación fue 11.1 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA, donde se obtuvieron 1.9 brotes por explante después de 12 semanas de cultivo. En contraste, los explantes establecidos en medio MS sin reguladores de crecimiento produjeron en promedio 1 brote por explante después de 12 semanas de cultivo (Cuadro 6, Figura 6a).

El uso de una citocinina en combinación con dos auxinas y ácido giberélico adicionadas al medio de cultivo MS son eficaces en la inducción de brotes así lo reportó Coello *et al.* (2010) para la orquídea *Guarianthe skinner* donde con 16.1 μM de ANA, 17.1 μM de AIA, 6.3×10^{-9} μM de GA₃ y 0.0023 μM de BA se obtuvieron 10.6 brotes.

Cuadro 6. Brotación (B, %), número de brotes por explante (BE), y porcentaje de formación de callo (C, %) en explantes de hoja de *Echeveria laui* con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftanelacético (ANA) a las cinco, diez y doce semanas de cultivo.

BAP + AIA + ANA (μM)	4 semanas			8 semanas			12 semanas		
	B (%)	BE (Núm.)	C (%)	B (%)	BE (Núm)	C (%)	B (%)	BE (Núm)	C (%)
0 + 0 + 0	10 a	0.1 a	20 a	70 a	0.7 a	20 a	90 a	1 b	30 a
1.4 + 1.0 + 1.7	10 a	0.1 a	30 a	40 a	0.4 a	40 a	90 a	0.9 b	40 a
1.9 + 1.0 + 1.7	10 a	0.1 a	30 a	50 a	0.6 a	40 a	90 a	1.2 a	40 a
2.4 + 1.0 + 1.7	20 a	0.2 a	30 a	70 a	0.9 a	40 a	90 a	1.7 a	40 a
2.9 + 1.0 + 1.7	20 a	0.2 a	2 a	80 a	1.1 a	40 a	100 a	1.9 a	40 a
3.4 + 1.0 + 1.7	10 a	0.1 a	40 a	80 a	0.8 a	40 a	80 a	1.4 a	50 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

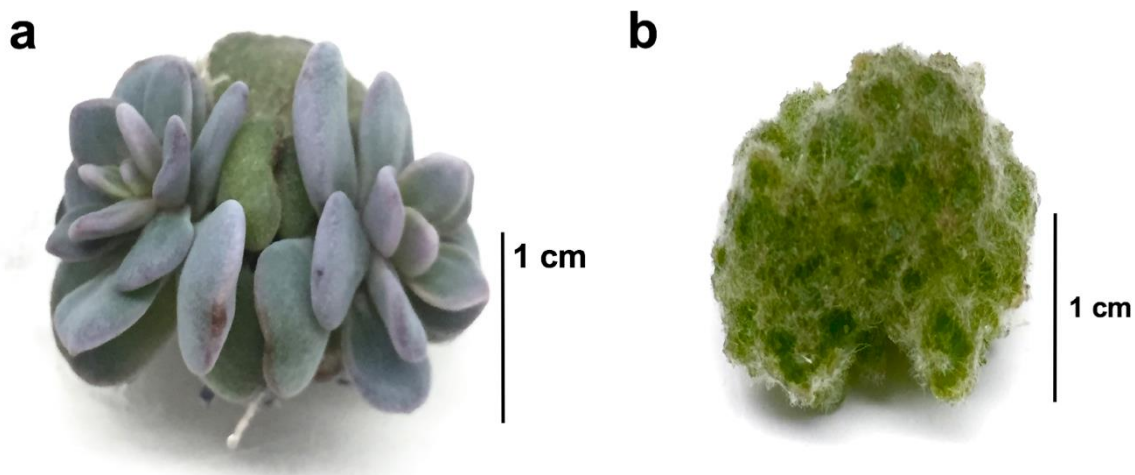


Figura 6. Multiplicación de brotes de *Echeveria laui*. a) Brote después de 12 semanas de cultivo en medio MS con 11.1 μM de BAP+1 μM de AIA+1.7 μM de ANA; b) Callo friable formado después de 12 semanas de cultivo en medio MS con 3.4 μM de BAP, 1.0 de AIA μM y 1.7 μM de ANA.

En todos los tratamientos evaluados en esta etapa de multiplicación se presentó la formación de callo. Al adicionar 3.4 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 μM de ANA se formaron callos friables de color verde en 50% de los explantes (Figura 6b). Seemann *et al.* (2007) reportaron el 100% de formación de callo *in vitro* para la cactácea *Mammillaria elongata* al usar medio MS con 8.8 μM de BAP y 0.6 μM de ANA a las 12 semanas de cultivo. Esta respuesta morfológica observada en *E. laui* podría representar una vía para futuros estudios de regeneración *in vitro* de la especie por organogénesis indirecta.

5.4.3 Enraizamiento de brotes

En la presente investigación se observó que la adición de las auxinas AIB ó ANA en el medio de cultivo MS no promovió la mejor respuesta rizogénica. Con 9.1 μM de AIB se obtuvo un promedio de 10.8 raíces por explante mientras que con 4.5 μM de ANA formaron en promedio 5.3 raíces por explante (Cuadro 7).

Cuadro 7. Enraizamiento *in vitro* de brotes de *Echeveria laui* en medio MS con 50% de concentración de sales, ácido naftanelacético (ANA) y ácido indo-3-butírico (AIB) a las ocho semanas de cultivo.

ANA (μM)	AIB (μM)	Enraizamiento (%)	Raíces (Núm)
0	0	100 a	16.6 a
5.2	0	100 a	6.9 c
10.6	0	100 a	10.8 b
0	4.5	100 a	5.3 c
0	9.1	100 a	6.0 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En cambio, el medio de cultivo con la mitad de sales minerales y sin reguladores de crecimiento favoreció el mayor número de raíces (16.7) en promedio por explante (Figura 7a-b). En este sentido se observó que, desde la primera semana la totalidad de los explantes presentaron la formación de raíces en comparación con los explantes cultivados con AIB o ANA. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Moreno-Bermúdez *et al.* (2018) donde 100% de las plantas *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* produjeron raíces a los 15 días de cultivo en medio MS sin reguladores de crecimiento; el sistema radicular alcanzó dos y tres veces la altura de la parte aérea de las plantas. En cactáceas del género *Turbinicarpus* el enraizamiento de brotes resultó eficiente en medio MS con 2 g L^{-1} de carbón activado y sin reguladores de crecimiento (de-la-Rosa-Carrillo *et al.*, 2012)

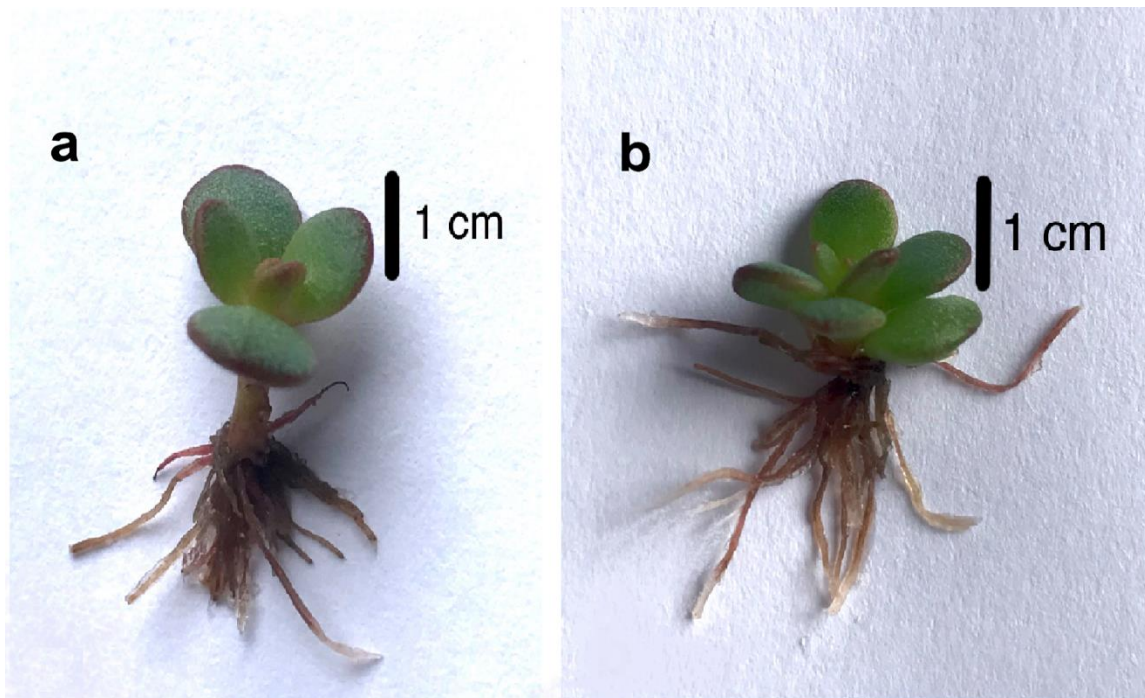


Figura 7. Plantas enraizadas de *Echeveria laui* en medio MS con 50% de concentración de sales. a) Planta después de 4 semanas de cultivo; b) Planta después de 8 semanas de cultivo.

En aquellas especies vegetales donde el enraizamiento se presenta de forma espontánea se ha reportado que las auxinas endógenas producidas en el ápice del tallo se transportan basipetalmente a la superficie del corte y actúan como desencadenantes del proceso (Moreno-Bermudez *et al.*, 2018). Así mismo, se ha indicado que la dilución del medio MS es una estrategia de uso frecuente para estimular el enraizamiento *in vitro* (Nourissier y Monteuis, 2008; Shah *et al.*, 2008).

5.4.4 Aclimatación de plantas

Para la aclimatación de plantas de *Echeveria laui*, se tomaron 40 plantas *in vitro* con cinco hojas bien formadas, se utilizaron mezclas de diferentes sustratos, la supervivencia se contabilizó a las doce semanas del trasplante. Las mejores combinaciones fueron turba con perlita y turba con tezontle. Se obtuvo 90% de supervivencia con la mezcla de turba y perlita (1:1) con un promedio de 8.3 hojas formadas por roseta y 0.61 mm de raíz (Figura 8a) y la combinación de turba con tezontle (1:1) se obtuvo el 90% de

supervivencia con un promedio de 8.8 hojas formadas por roseta y 0.34 mm de longitud de la raíz (Cuadro 8, Figura 8b).

Cuadro 8. Aclimatación de plantas *in vitro* de *Echeveria laui* en diferentes sustratos.

Sustrato	Supervivencia (%)	Longitud de raíz (mm)	Hojas (Núm)
Turba + Perlita (1:1)	90 a	0.61 a	8.3 a
Turba + Tezontle (1:1)	90 a	0.34 b	8.8 a
Turba + Perlita + Tezontle (1:1:1)	70 b	0.21 b	7.2 a
Tezontle (1:1)	80 b	0.22 b	7.7 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

La elección del sustrato forma parte importante en la calidad de plantas, que se refleja en longitud y en follaje, entre otras características (Di Gioia *et al.*, 2017). La porosidad del sustrato juega un papel primordial en el desarrollo de la planta y la perlita además de ser un sustrato poroso retiene humedad, los suelos franco-arenoso, son caracterizados por ser porosos y proporcionar una mejor aireación (Benvenuti, 2003).

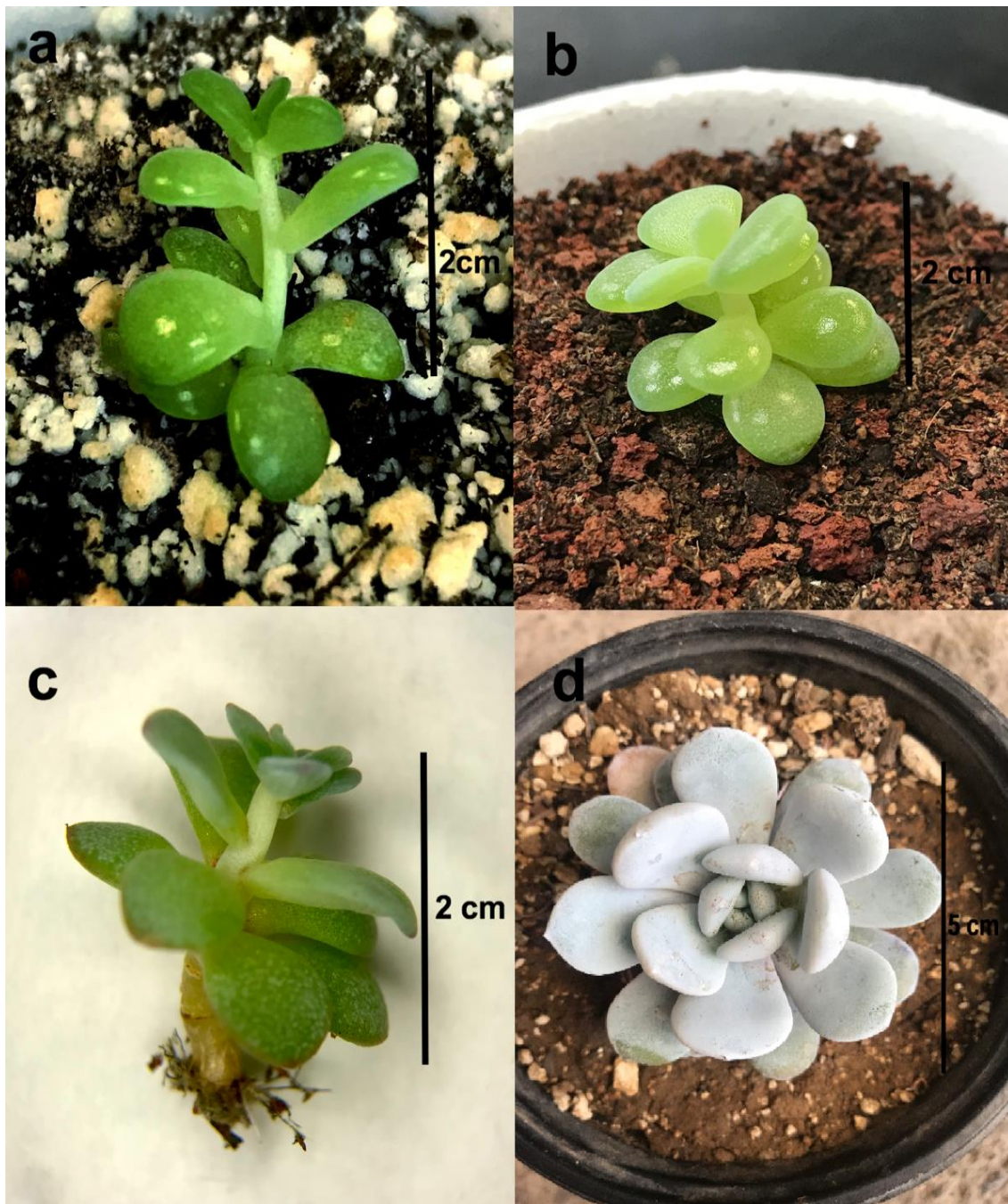


Figura 8. Acclimatación de plantas de *Echeveria laui* después de 12 semanas. a) Planta en mezcla de turba y perlita (1:1); b) Planta en mezcla de turba y tezontle (1:1); c) Planta con ocho hojas y raíz desnuda; d) Planta aclimatada a condiciones de invernadero.

Si bien se considera que las echeverias no son plantas muy exigentes con la composición del sustrato en macetas, basta con una mezcla de base orgánica que contenga suficientes partículas gruesas para un buen drenaje (Lorraine *et al.*, 2005). La mezcla de turba y perlita resultó igual de eficiente que la mezcla de turba y tezontle en cuestión de supervivencia. Sin embargo, el desarrollo de hojas se vio mayormente favorecido con la combinación de turba y tezontle, en contra parte, con la combinación de turba y perlita se obtiene mayor longitud de raíz (Figura 8c).

En todas las plantas la apariencia de la roseta era de coloración verde claro, con tallos delgados y con poca presencia de pruina característica de esta especie (Figura 8d). Esto podría deberse a que la cantidad de luz no fue suficiente en la etapa de aclimatación, esto lo explican Lorraine *et al.*, (2005) al señalar que la dirección desde la cual recibe la luz la planta es un factor importante para determinar qué tan bien crecen las echeverias, siendo lo mas optimo un techo transparente que deje pasar al menos el 50% de luz, si un techo es opaco y la luz solo entra por los lados, las plantas tienden a crecer alargadas provocando la inclinación de estas hacia un lado, esto concuerda con lo mencionado por Piña-Poujol *et al.* (2007) quienes indican que las plántulas de *E. laui* que crecen bajo luz directa alcanzan un mayor tamaño que las que crecen bajo malla sombra; coincide también, con lo señalado por Arellano-Ostoa *et al.*, 2020 para la especie de *E. pumila*, quienes mencionan que la cantidad de luz a la que se expone esta especie es esencial para la formación de un tallo fuerte y de mayor diámetro.

Es importante resaltar que con este sistema de regeneración (por organogénesis) y propagación *in vitro* de *E. laui* es factible obtener 81 plantas de tamaño uniforme en un período de 12 meses, por lo que, al establecer la propagación masiva *in vitro* de esta especie se puede inferir que sería posible satisfacer su demanda de mercado, evitando así, el saqueo de su habitat natural y contribuyendo a su conservación.

5.5 Resumen de resultados de regeneración *in vitro* de *Echeveria laui*

El protocolo de regeneración *in vitro* de *Echeveria laui* por organogénesis directa establecido en el presente estudio involucra seis etapas (cultivo aséptico, germinación, inducción, multiplicación, enraizamiento y aclimatación) que se pueden observar en el diagrama de flujo que resume la metodología establecida y los resultados significativos en la regeneración *in vitro* de *Echeveria Laui*. (Fig. 9).

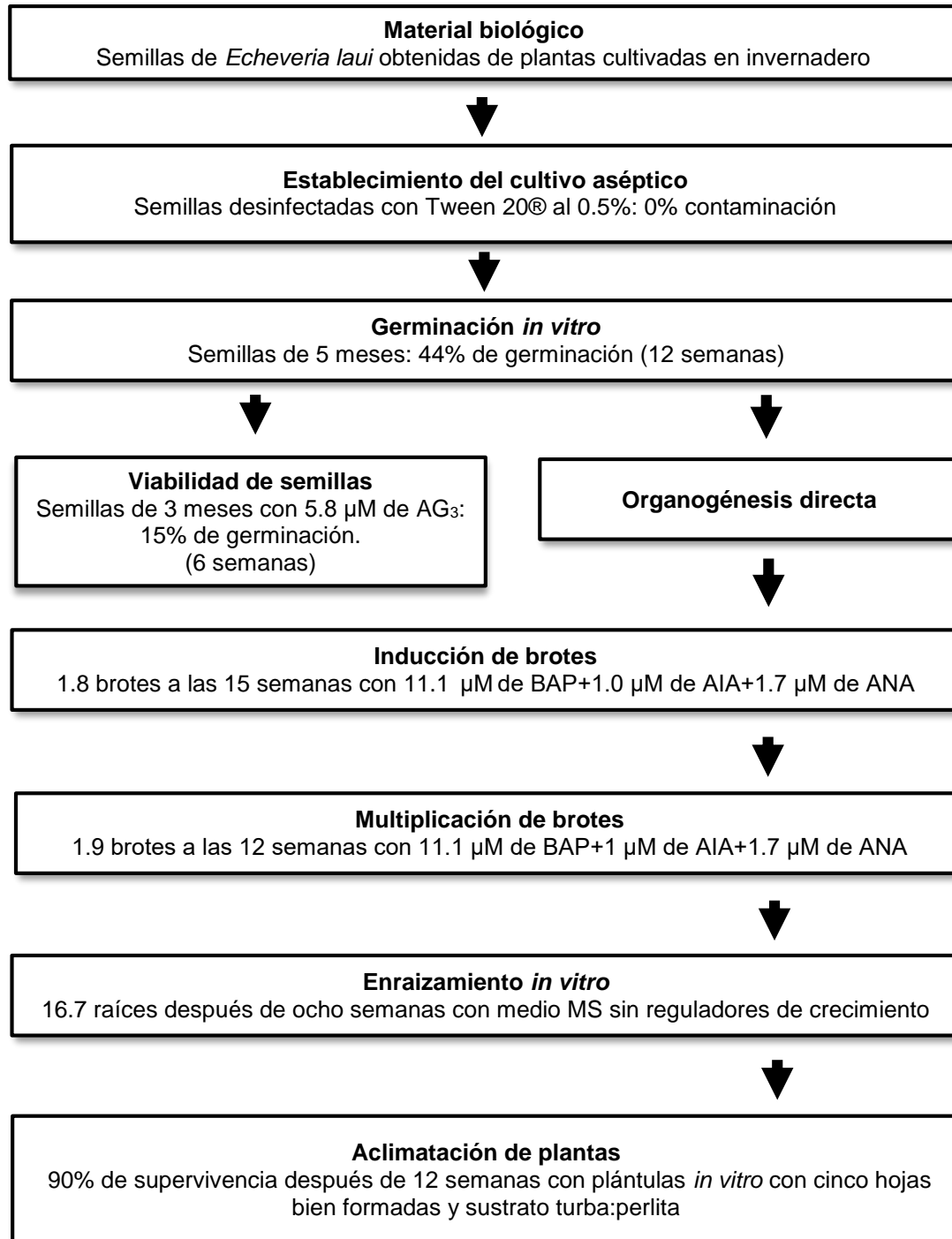


Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología establecida y resultados significativos de la morfogénesis (regeneración por organogénesis directa) *in vitro* de *Echeveria laui*.

VI. CONCLUSIONES

- La desinfección superficial de semillas de *Echeveria laui* se obtuvo con 0.5 % Tween® durante 10 minutos de inmersión.
- Las semillas de tres meses de edad de *Echeveria laui* se mantuvieron viables hasta por tres meses con una germinación de 15%.
- El mayor porcentaje de germinación (44%) de *Echeveria laui* se consiguió con semillas de cinco meses de almacenamiento desinfectadas con Tween 20®.
- La inducción de 1.8 brotes de *Echeveria laui* se logró con explantes de hoja de 1-2 cm de longitud disecados de plántulas cultivadas *in vitro* en medio MS con 11.1 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 1.7 $\mu\text{M L}^{-1}$ de ANA a las 15 semanas de cultivo.
- La mayor multiplicación de brotes (1.9 brotes por explante) de *Echeveria laui* se adquirió con explantes de hojas de 1-2 cm con 11.1 μM de BAP + 1.0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA + 1.7 μM de ANA a las 12 semanas.
- Con el sistema de regeneración *in vitro* desarrollado, es posible obtener en un lapso de 12 meses, 5.4 brotes por explante en medio MS suplementado con 11.1 μM de BAP + 1.0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA + 1.7 μM de ANA.
- El uso de los reguladores de crecimiento BAP+ AIA+ ANA en la fase de multiplicación indujo la formación de callos en 40% de los explantes de hoja de *Echeveria laui*.
- El mayor número de raíces *in vitro* (16.7) de *Echeveria laui* se alcanzó en medio MS con 50% de concentración de sales sin reguladores de crecimiento.
- La mayor tasa de supervivencia (90%) y mayor número de hojas formadas en plantas de *Echeveria laui* en la etapa de aclimatación fue de 8.3 en mezcla de turba+tezontle (1:1) después de 12 semanas.

VII. RECOMENDACIONES

- Estudiar la viabilidad de germinación en semillas de uno y dos meses de edad de *Echeveria laui*.
- Mejorar la tasa de germinación de semillas de *Echeveria laui* mediante pruebas de viabilidad y calidad fisiológicas *in vivo* previas a los tratamientos de desinfección
- Estudiar la viabilidad de polen con la finalidad de asegurar la polinización de la flor.
- Establecer la regeneración *in vitro* de *Echeveria laui* por organogénesis indirecta.
- Valorar los ápices de *Echeveria laui* como explante en la ruta morfogénica.
- Evaluar efecto de la luz directa en etapa de aclimatación.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acevedo-Rosas, R., K. Cameron, V. Sosa, and S. Pell. 2004. A molecular phylogenetic study of *Graptopetalum* (*Crassulaceae*) based on ETS, ITS, RPL16, and TRNFL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 91:1099-1104.
- Acosta C., C. 2012. La micro propagación en especies forestales. *Ciencia Actual* 2:62-80.
- Acosta A., J. A. 2015. Embriogénesis somática en café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil. Colombia. 52 p.
- Ahmed, A., and R. Taha. 2014. Indirect regeneration and somatic embryogenesis from leaf and stem explants of *Crassula ovata* (Mill.) Druce - An ornamental medicinal plant. *Internacional Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 8:1310-1316.
- Akinpelu, D. A. 2000. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia* 71:193-194.
- Alcántara-Cortes, J. S., M. G. Castilla-Pérez, y R. M. Sánchez-Mora. 2017. Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* 1:71-83.
- Ammirato P.V. 1986. Control and expression of morphogenesis in culture. *In: Withers L.A. and P. G. Anderson (eds.) Plant Tissue and its Agricultural Applications.* University Press Cambridge. United States pp. 23-45.
- Andrade, J. L., E. de la Barrera, C. Reyes-García, M. F. Ricalde, G. Vargas-Soto, y J. C. Cervera. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Botanical Sciences* 81:37-50. <https://doi.org/10.17129/botsci.1764>
- Arellano-Ostoa, G., S. Lagunas-Santiago, M. A. Alvarez-Ruiz, E. E. Villavicencio-Gutiérrez, and R. I. Rojas-Martínez. 2020. *In vitro* multiplication and rooting of *Echeveria pumila* Lem. free of phytoplasmas. *Acta Horticulturae* 1288:193-198.
- Aremu A., L. Plačková, A. Pěnčík, O. Novák, K. Doležal, and J. Van Staden. 2016. Auxin-cytokinin interaction and variations in their metabolic products in the regulation of organogenesis in two *Eucomis* species. *New Biotechnology* 33: 883-890.
- Arias S., U. Gúzman, M.S. Mandujano, M. Galvan S., and J. Golubov. 2005. Mexican cacti species at risk of extinction, A comparison between the listed NOM-059-ECOL 2001. The red list (IUCN) and CITES, *Mexican Cacti and Succulent* 50:100-125.

- Ayala-González, C., y E. N. Obledo-Vázquez. 2015. Comparación de la tasa de propagación *in vitro* y *ex vitro* de la especie endémica de michoacán, *Echeveria purhepecha*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco. México. 7p.
- Azcón-Bieto, J., y M. Talón. 2001. Fisiología y bioquímica vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.
- Bae, K. H., M. S. Ko, N. Y. Kim, J. M. Song, and G. P. Song. 2012. *In vitro* propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture. Journal of Plant Biotechnology 39:114–120. <https://doi.org/10.5010/jpb.2012.39.2.114>
- Barbón, R., I. Borroto, M. Pérez, y O. La. 2006. Embriogénesis somática de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. en medios de cultivo semisólidos. Biotecnología Vegetal 6:67-71.
- Benvenuti S. 2003. Soil texture involvement in germination and emergence of buried weed seeds. Agronomy Journal 95:191-198.
- Berger A. 1930. Crasulaceae. *In*: Engler, A. and K. Prantl (eds.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Second edition. Verlag Wilhem Englemann, Leipzig, Germany. pp 352-348.
- Bravo-Ávila, F. M. , A. Rodríguez-Sahagún, O. A. Castellanos-Hernández, y D. Ruvalcaba-Ruiz. 2016. Regeneración de *Sedum praealtum* A. DC (siempreviva) vía organogénesis. Nova Scientia 8: 126-139
- Bulbarela M., J. E. 2014. Obtención *in vitro* de plantas de *Echeveria pumila* cv. 'Glauca' libres de bacterias y fitoplasmas asociados a la fasciación del tallo. Tesis de Maestría en Ciencias. Fitopatología, Colegio de Posgraduados. Texcoco, México. 109 p.
- Cabrera-Luna, J. A., V. Serrano-Cárdenas, y R. Pelz-Marín. 2007. Plantas vasculares comercializadas como ornamentales decembrinas en 12 municipios de Querétaro, México. Polibotánica 24:117-138.
- Cappelletti, R., S. Sabbadini, and B. Mezzetti. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. Scientia Horticulturae 207:117–124.
- Cardoza V. 2005. Tissue culture: The manipulation of plant development. *In*: Stewart J. C.N. (ed.). Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, U.S.A. pp: 113-134.
- Carrillo-Reyes, P., V. Sosa, and M. E. Mort. 2008. *Thompsonella* and the “*Echeveria* group” (*Crassulaceae*): phylogenetic relationships based on molecular and morphological characters. Taxon 57:863-874
- Casanova P., N. M., V. Bertolini, y L. Iracheta D. 2019. Establecimiento *in vitro* de *Monstera acuminata* Koch y *Monstera deliciosa* Liebm. Acta Agronómica 68:196-204.

- Castillo, A. 2010. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay. 8 p. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf> (Consulta: septiembre 2021).
- Chaudhury, A. and Q. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-Benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:113-120.
- Chiquete-Carrillo, J., E. Romo-Martínez, N. García-Magallanes, e I. Benítez-García. 2016. Desinfestación *in vitro* de explantes de *Kalanchoë pinnata* para la obtención de células desdiferenciadas. *Revista de Ciencias de la Salud* 13:11-18.
- Christianson, M. L. and D. A. Warnick. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *Horticultural Science* 23:515-519.
- Christianson, M. L., and J. S. Hombuckle. 1999. Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria Hygrometrica*. *American Journal of Botany* 86:1645-1648.
- Coello, C. Y., C. Miceli, C. Orantes, L. Dendooven, and F. Gutierrez. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W. E Higgins. *Gayana Botánica* 67: 19-26.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2016. Enciclovida. Roseta, *Echeveria laui*. <https://enciclovida.mx/especies/153279-echeveria-laui>
- Cruz A., M., L. M. Melgarejo, y M. Romero. 2010. Fitohormonas. In: Melgarejo, L. M. (Ed). Experimentos en Fisiología Vegetal. Universidad Nacional de Colombia. pp 39-62.
- Daquinta G., M., L. Ramos, Y. Lezcano, R. Rodríguez, y M. Escalona. 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotecnología Vegetal* 1:39-44.
- Davies, R. L., and S. Etris. 1997. The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today* 36:107-114.
- de-la-Rosa-Carrillo, M. L., M. S. Domínguez-Rosales, M. E. Pérez-Reyes, y E. Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbiniacarpus*. *Interciencia* 37: 114-120.
- De-Menezes G., L., M. F. P. S. Machado, P. Ballesta, F. Mora, M. A. Milaneze G., y C. A. Mangolin. 2016. Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia* 34:47-54.
- Denton, M. F. 1982. Revision of *Sedum* section Gormanina (Crassulaceae). *Brittonia* 34: 48-77.

- Di Gioia F., P. De Bellis, C. Mininni, P. Santamaria, and F. Serio. 2017. Physicochemical, agronomical and microbiological evaluation of alternative growing media for the production of rapini (*Brassica rapa* L.) microgreens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:1212-1219.
- Estrada P., V. Galvan, y V. Flores. (2008) Siempreviva: un espermicida natural y avances de su caracterización fotoquímica. *Investigación Científica*. 4:1-9.
- Franco, M. 1997. Legislación y Conservación. In: *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-SEMARNAP, México. 143 p
- George, E. F., M. A. Hall, and G. J. De Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. Springer. Netherlands. 502 p.
- Góes-Junghams, T., A. Da Silca-Souza; J. dos Santos-Serejo, y F. Vidigal. 2009. Redução de custos na Micropropagação. In: Góes-Junghams, T. y A. da Silca-Souza (Eds.). *Aspectos Práticos sa Micropropagação de Plantas*. Editorial: EMBRAPA Cruz das Almas. Brasil. 185 p
- Gubis, J., Z. Lajchova, J. Faragó, and Z. Jureková. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 39: 9–14.
- Herppich, W. B., and K. Peckmann. 2000. Influence of drought on mitochondrial activity, photosynthesis, nocturnal acid accumulation and water relations in the CAM plants *Prenia sladeniana* (ME-type) and *Crassula lycopodioides* (PEPCK-type). *Annals of Botany* 86:611-620.
- Jiménez G., A., B. A. Zhindón G., B. S. Indacochea G., y M. P. Ramos R. 2017. Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L. *Revista Científica Multidisciplinaria* 1:1-6.
- Jimeno-Sevilla H., A. M. Hernández-Ramírez, J. F. Ornelas, and S. Marten-Rodríguez (2014) Morphological and nectar traits in *Echeveria rosea* Lindley (Crassulaceae) linked to hummingbird pollination Central Veracruz, México. *Haseltonia* 19:17-25.
- Kertrung, T., and S. Junkasiraporn. 2018. *In vitro* propagation of *Kalanchoe hombopilosa* (Crassulaceae). *International Journal of Science* 15:37-48.
- Khan, S., S. Naz, K. Ali and S. Zaidi. 2006. Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips. *Pakistan Journal of Botany* 38:977-981.
- Kim, Y.H., G.Y. Lee, H.H. Kim, J.H. Lee, J. Jung, and S.D. Lee. 2019. Establishment of tissue culture and acclimatization method for *in vitro* mass propagation of *Echeveria laui* and *Echeveria elegans*. *Journal of Plant Biotechnology* 46:22-31.
- Kimnach, M. 2003. *Echeveria*. In: Egli, U. (ed.). *Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 103-128.

- Kitamura, Y., K. Kubo, L. Rahman, and T. Ikenaga. 2002. Reproduction of *Sedum drymarioides*, an endangered rare species, by micropropagation. *Plant biotechnology* 19:303-309.
- Kozai, T., and M. A. L. Smith. 1995. Environmental control in plant tissue culture - general introduction and overview. *In: Aitken-Christie, J., T. Kozai, and M. A. L. Smith (eds.). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. pp: 910-927.*
- Krikorian, A. D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. *In: Davies, P. J. (ed.). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands. Pp: 774-796.*
- Kumari A., P. Baskaran, and J. Van Staden. 2016. *In vitro* propagation and antibacterial activity in *Cotyledon orbiculata*: a valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 124:97-104.
- La Troje Sierra Norte. 2014. *Cátalogo 2014: ornamentales, aromáticas y crasuláceas.* Sitio Web: https://issuu.com/latrojesierranorte/docs/catalogo_2014_web_ornamentales_arom/18 (Consulta: abril, 2021).
- Larcher, W. 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups.* Springer. Fourth edition. Berlín. 514 p.
- Liu, B., Y. Zhang, K. Zhang, H. Fang, X. Zhang, R. Fu, X. Qiu, and R. Xu. 2016. The efficient culture system of *Orostachys fimbriata*. *Agricultural Sciences* 7:175-180.
- Litz, R.E., y R. L. Jarret. 2004. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *Tropical Research Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E.U. pp: 144-157.*
- López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera, y C. Loaiza-Alanís, 2016, Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus playacanthus* link et Otto (Cactaceae). *Polibotanica* 42:153-166.
- Lorraine, S., and K. Atilla, 2005, *Echeveria* cultivars. Schulz Publishing. Teesdale, Australia. 208 p.
- Ludwing-Müller, J., and J. D. Cohen, 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum* 115:320-329.
- Martínez V., J. A. 2009. Germinación de *Sedum oxypetalum* H.B.K. (Crassulaceae) en ambientes contrastes del Ajusco Medio, D. F. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 65 p.
- Martínez-Villegas Y. M., M. Andrade-Rodríguez, M. T. Colinas-León, O. G. Villegas-Torres, A. Catillo-Gutiérrez, e I. Alia-Tejacal. 2015 Efecto de las sales inorgánicas del

- medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana* 38:369-374.
- Martorell, C. 2007. Detecting and managing an overgrazing-drought synergism in the threatened *Echeveria longissima* (Crassulaceae): the role of retrospective demographic analysis. *Population Ecology* 49:115-125.
- Mathur, L., and C. Koncz. 2005. Callus and culture regeneration. In: Martínez-Zapater, J., and J. Salinas (eds.). *Methods in Molecular Biology Vol. 82. Arabidopsis Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp: 31-34.
- Mayuzumi, S., and H. Ohba, 2004. The phylogenetic position of eastern Asia *Sedoideae* (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* 29:587-598.
- Meyrán G., J., y L. López C. 2003. *Las Crasuláceas de México*. Sociedad Mexicana de Cactología, A.C. México. 286 p.
- Mohaddeseh, K., K. Behzad, and H. Davood. 2013. *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. *European Journal of Experimental Biology* 3:285-288.
- Molnar, Z., E. Virag, and V. Ordog. 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis* 15:123-127.
- Monroy, R., R. Monroy-Ortiz, y C. Monroy-Ortiz. 2012. *Las unidades productivas tradicionales frente a la fragmentación territorial*. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. 223 p.
- Moran, R., y J. Meyrán. 1976. *Echeveria laui*, una nueva especie de Oaxaca. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 21:59-62.
- Moran, R. V., and C. H. Uhl. 1964. The inflorescence of *Echeveria*. *Cact. Succ. J. (Los Angeles)* 36:167-180.
- Moreno-Bermúdez, L. J., M. Pérez, Y. Fernández, M. La O, y L. R. García. 2018. *Aclimatización ex vitro de Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. *Biotechnología Vegetal* 18:1-15.
- Mort, M. E., D. E. Soltis, P. S. Soltis, J. Francisco-Ortega, and A. Santos-Guerra 2001. Phylogenetic relationships and evolution of the Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. *American Journal of Botany* 88:76-91.
- Mort, M. E., N. Levens, C. P. Randle, E. Van Jaarsverd, and A. Palmer. 2005. Phylogenetics and diversification of Cotyledon (Crassulaceae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92:1170-1176.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Nourissier, S., and O. Monteouis. 2008. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 44: 263-272.
- Parra-Tabla, V., C. F. Vargas, and L. E. Eguiarte. 1998. Is *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae) fecundity limited by pollen availability? An experimental study. *Funcional Ecology* 12:591-595.
- Peng, J., and N. P. Harberd, 2002. The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5:376-381.
- Pérez-Bernal, M., M. Delgado, C. A. Hernández, y R. Armas. 2008. Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma. *Cultivos Tropicales* 29:23-28.
- Pérez-Calix, E. 2008. *Crassulaceae*. In: Rzedowski, J. y G. Calderón (eds.). *Flora del bajo y de las regiones adyacentes*. Instituto de Ecología, A. C. México. pp 1-143.
- Pérez-Calix, E., e I. S. Franco-Martínez. 2004. Crasuláceas. In: A.J. García, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología. UNAM Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza. World Wildlife Fund, México. 209-217.
- Pérez-Martínez, B. A., y S. L. Castañeda-Garzón. 2017. Establecimiento *in vitro* de compuestas nativas silvestres a partir de cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana* 19:1-10.
- Piña-Poujol, P., M. T. Valverde-Valdés, y J. Reyes-Santiago. 2007. Propagación de la especie en peligro de extinción *Echeveria laui* con fines de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52:4-19.
- Prieto E., H., M. Jordan Z., L. P. Barrueto C., M. C. R. Cordeiro, y D. J. Durzan. 2005. *Biología Vegetal*. Instituto de Investigación Agropecuarias (INIA). Santiago, Chile. 218 p.
- Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:285-301.
- Radice, S. 2004. Morfogénesis *in vitro*. In: Echenique, V., C. Rubistein, L. Mroginski (eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires: INTA. 10 p.
- Ramírez-González, G., J. L. Rodríguez-de-la-O, J. Martínez-Solís, y M. T. Colinas-León. 2019. Germinación y crecimiento *ex vitro* e *in vitro* de cinco especies de cactáceas del género *Mammillaria*. *Polibotanica* 48:99-110.
- Retes P., J. L., M. L. Valdez A., M. E. Pérez R., y E. Pérez-M-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*,

- Melocactus y Polaskia (Cactaceae)*. Boletín de la Sociedad Botánica de México 81: 9-16
- Reyero S., M. R. 2009. Determinación de la dinámica estomática de *Echeveria laui* (CRASSULACEAE) en individuos obtenidos de propagación vegetativa y sexual. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores de Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, México. 92 p.
- Reyes S., J. y C. Brachet I. 2009. *Echeveria mondragoniana*, una especie de la familia Crassulaceae para el estado de Oaxaca, México. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 54:82-89.
- Reyes S., J., A. Gutiérrez de la R., y J. Sevilla B. 2001. Producción de cactáceas y suculentas mexicanas. Cuadernos de comunicación sindical Número 63. México. 23 p.
- Reyes S., J., C. Brachet I., J. Pérez C., y A. Gutiérrez de la R. 2004. Cactáceas y Otras Plantas Nativas de la Cañada, Cuicatlán, Oaxaca. Sociedad Mexicana de Cactología A.C. México. 196 p.
- Reyes S., J., M. A. Islas L., y O. González Z. 2014. Guía práctica de propagación y cultivo de las especies del género *Echeveria*: también conocidas como conchitas, lengua de vaca, magueyitos, rosetas y tememetla. Palabra en Vuelo. Instituto de Biología, UNAM. México. 77 p
- Reyes-Santiago, P. J., M. A. Islas-Luna, O. González-Zorzano, P. Carrillo-Reyes, F. R. Vergara-Silva, y C. P. Brachet-Ize. 2011. *Echeveria*. Manual del perfil diagnóstico del género *Echeveria* en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 139 p.
- Roca, W. M., y L. A. Mroginski. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969 p.
- Rodríguez-Rojas, T. J., M. Andrade-Rodríguez, J. Canul-Ku, A. Castillo-Gutiérrez, E. Martínez-Fernández, y D. Guillén-Sánchez. 2016. Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies de *Echeveria* en condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6:111-123.
- Rojas-Aréchiga, M., C. Vázquez-Yanes, and A. Orozco-Segovia. 1998. Seed responses to temperatura of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. Plant Ecology 135:207-241.
- Saad, A. I. M. and A. M. Elshahed. 2012. Plant tissue culture media. *In*: Leva, A. and L. Rinaldi (eds.). Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. IntTech. Rijeka, Croacia. pp 29-39.
- Sala, F., y M. Labra. 2003. Somaclonal variation. *In*: Thomas, B., D.J. Murphy, and B. Murray (eds.) Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford, UK. Academic Press Elsevier. pp 1417-1422.

- Salisbury. F. B., y C. Ross. 2000. Fisiología de las Plantas. 2. Bioquímica Vegetal. Traducido por: Manuel Jose Alonson García. Paraninfo. Madrid, España. 232 p.
- Salomé-Castañeda, E., N. Álvarez-Acevedo, and J. Landaverde-Vaca. 2019. Vegetative propagation of *Echveria gibbiflora* "Helena", through the generation of vegetative shoots in floral stems. *Acta Horticulturae* 1263:99-104.
- Sánchez-Morán, M., y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando metatopolina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactaceas y otras Suculentas* 4:16-18.
- Sanikhani, M., S. Frello, and M. Serek. 2006. TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 85:75-82.
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, G. Halffter, I. March, A. Mohar, S. Anta, J. de la Maza, y J. Llorente. 2009. Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 96 p.
- SAS Institute. 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Schwarz, O. J., A.R. Sharma, and R. M. Beaty. 2005. Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. *In: Trigiano, R. N., and D. J. Gray (eds.). Plant Development and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 159-172.
- Seemann, P., C. Rodríguez, y G. Jara. 2007. Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación *ex situ*. *Agro Sur* 35:24-26.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2010, 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 diciembre. México.
- Shah, S. T., R. Zamir, J. Ahmad, H. Ali, and G. Lutfullah. 2008. *In vitro* regeneration of plantlets from seedlings explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. *Pakistan Journal of Botany* 40:1195-1200.
- Shahzad A., S. Sharma, S. Parveen, T. Saeed, A. Shaheen, R. Akhtar, V. Yadav, A. Upadhyay, and Z. Ahmad. 2017. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. *In: Abdin M., U. Kiran, and A. A. Kamaluddin (eds.). Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_1
- Sharry, S., M. Adema, y W. Abedini. 2015. Plantas de Probeta: Manual para la Propagación de Plantas por Cultivo de Tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. 240 p.

- Silva, H., E. Acevedo, y P. Silva. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:341-351.
- Smith, R. H. 2012. *Plant Tissue Culture - Techniques and Experiments*. Elsevier Science Publishing Co Inc. 3th ed. United States of America. 202 p.
- Solis, J. J., M. Reyna, M. de Fera, M. A. Cardona, and D. Rojas. 2013. *In vitro* propagation of *Echeveria elegans*, a Species of the flora endangered Mexican. *Journal of Environmental Science and Engineering* 2:555-558.
- Su-Juan Z., Z. Zhong-Chun, G. Xiana, T. Gulsum, and Q. Bao-Sheng. 2009. Plant regeneration of the mining ecotype *Sedum alfredii* and *Cadmium hyperaccumulation* in regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99:9-16.
- Tadeg, H., E. Mohammed, K. Asres, and T. Gebre-Mariam. 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100:168-175.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates. Massachusetts. USA. 690 p.
- Thiede, J. 1995. Quantitative phytogeography, species richness, and evolution of American Crassulaceae. *In: Hart, H. and U. Egli (Eds.). Evolution and systematics of the Crassulaceae*. Backhuys Publishers. Leiden. pp: 89-123.
- Thiede, J., and U. Egli. 2007. *Crassulaceae*. *In: Kubitzki, K. (ed.). The families and Genera of Vascular Plants*. Vol. 9. Springer, Hamburg, Germany. pp: 83-118.
- Thorne, R. F. 2000. The classification and geography of the flowering plants: Dicotyledons of the class Angiospermae (subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Asteridae, and Lamiidae). *The Botanical Review* 66:441-647.
- Thorne, R. F., and J. L. Reveal. 2007. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). *The Botanical Review* 73:67-181.
- Thorpe, T. A. 2014. History of plant tissue culture. *In: Loyola-Vargas, V. M., and F. Vazquez-Flota (Eds.). Methods in Molecular Biology, Vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp: 9-32.
- Van Ham, R. C. H. J., and H. Hart. 1998. Phylogenetic relationships in the *Crassulaceae* inferred from chloroplast DNA restriction-site variation. *American Journal of Botany* 85:123-134.
- Vyas, S., S. Guha, M. Bhattacharya, and I. U. Rao. 2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Science Horticulture* 121:32-37.

- Walther, E. 1972. Echeveria. California Academy of Sciences. San Francisco. USA. pp:_.175-197
- Wojciechowiez, M. 2007. Comparison of regenerative potencial of petals, stamens and pistils of five *Sedum* species *in vitro*. Biodiversity Research and Conservation 5: 87-94.
- Xu, Z., and M. Deng. 2017. Identification and control of common weeds. Vol 2. Zhejiang University Press, Hangzhou and Springer Science+Business Media. China. 848 p. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1157-7_39
- Yang C., Y. Qin, X. Sun, S. Yuan, and H. Lin. 2012. Propagation of *Sedum spectabile* Boreau in leaf culture *in vitro*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40:107-112.
- Yildiz, M. 2012. The prerequisite of the success in plant tissue culture: High frequency shoot regeneration. *In*: Leva, A., and I.M.R. Rinaldi (eds.). Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Intechopen. pp: 63-90
- Yong, J. W. H., L. Ge, Y. F. Ng, and S. N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14:5144-5164.

APÉNDICE

Apéndice 1. Composición química del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (MS).

		Sales Inorgánicas		Compuestos Orgánicos	
		Macronutrientes (mg L ⁻¹)	Micronutrientes (mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1,650	KI	0.83	Myo-Inositol	100.0
KNO ₃	1,900	H ₃ BO ₃	6.2	Ácido Nicotínico	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	Piridoxina.HCl	0.5
MgSO ₂ ·7H ₂ O	370	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Tiamina. HCl	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Glicina	2.0
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8		
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3		

Apéndice 2. Cuadrados medios y su significancia del análisis del número de brotes y la brotación *in vitro* de *Echeveria laui* después de cinco, diez y quince semanas de cultivo.

Tiempo	Fuente de Variación	Número de brotes	Brotación (%)
5 Semanas	Tratamiento	0.3	0.29**
	Error	0.1	0.09
	C.V.	269.31	261.59
	R2	0.21	0.23
	Media	0.11	0.11
10 Semanas	Tratamiento	1.94**	0.97**
	Error	0.32	0.17
	C.V.	123.16	118.02
	R2	0.35	0.28
	Media	0.45	0.36
15 Semanas	Tratamiento	3.33**	0.47
	Error	0.68	0.24
	C.V.	105.4	96.26
	R2	0.30	0.18
	Media	0.78	0.49

Significativo ($p < 0.05$); NS= No significativo, C.V= Coeficiente de variación

Apéndice 3. Cuadrados medios y su significancia del análisis del número de brotes, la brotación y formación de callo *in vitro* de *Echeveria laui* después de cinco, diez y quince semanas de cultivo

Tiempo	Funetes de Variación	Número de brotes	Brotación (%)	Callogenesis (%)
4 Semanas	Tratamiento	0.03	0.05	0.06
	Error	0.13	0.14	0.22
	C.V.	266.15	278.3	168.17
	R2	0.10	0.10	0.16
	Media	0.13	0.13	0.28
8 Semanas	Tratamiento	0.59	0.27	0.1
	Error	0.36	0.21	0.25
	C.V.	80.85	71.85	132.92
	R2	0.28	0.28	0.17
	Media	0.75	0.65	0.38
12 Semanas	Tratamiento	1.55*	0.4	0.04
	Error	0.49	0.1	0.26
	C.V.	51.89	36.28	128.01
	R2	0.30	0.11	0.18
	Media	1.35	0.90	0.40

Significativo ($p < 0.05$); NS= No significativo, C.V= Coeficiente de variación