



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

RESCATE GENÉTICO DE *Calibanus hookeri* (LEM.) TREL.

MARÍA DEL ROSARIO CHÁVEZ MUÑOZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Rescate Genético de *Calibanus hookeri* (Lem.) Trel.**, realizada por la estudiante: **María del Rosario Chávez Muñoz**, 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
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)


DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

ASESOR (A)


DRA. YOLANDA FERNÁNDEZ PAVÍA

ASESOR (A)


M.C. ALFONSO MURATALLA LÚA

ASESOR (A)


DRA. MARIA DE LOS ÁNGELES RODRÍGUEZ ELIZALDE

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, agosto de 2022

RESCATE GENÉTICO DE *Calibanus hookeri* (LEM.) TREL.

María del Rosario Chávez Muñoz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Calibanus hookeri sinonimia *Beaucarnea hookeri*, endémica de México y con categoría de riesgo amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2010), su morfología que lo distingue es su caudex, de corteza fisurada color marrón grisáceo, hojas dispuestas en roseta casi sésiles distribuidas en el caudex dando una apariencia cespitosa. Se encuentra en lugares muy localizados y en poblaciones con pocos individuos. Por lo que, ante esta situación, la propagación *in vitro* es una opción para la satisfacer la demanda en el mercado hortícola, pero también para diseñar programas de reintroducción, contribuyendo a su conservación. Existen protocolos para propagar los géneros *Beaucarnea*, *Dasyllirion*, *Nolina* y *C. hookeri* mediante organogénesis directa en medio MS, suplementado con varias citocininas a altas concentraciones, pero no se ha estudiado el subcultivo de esta especie. El objetivo del presente trabajo fue generar un protocolo de subcultivo *in vitro* para *C. hookeri* mediante organogénesis directa de semillas germinadas *in vitro* en medio base MS suplementado con BAP (2.5 y 5 mg L⁻¹) y BAP+ANA (2.5, 5.0 + 0.1, 0.5 mg L⁻¹ respectivamente), con un testigo para cada establecimiento. Para los subcultivos se utilizó medio MS y brotes completos como propágulo. El ácido sulfúrico 4N permitió establecer las semillas *in vitro* almacenadas sin tratamiento previo. Se empleó un diseño experimental completamente al azar, en todos los experimentos. Los primeros subcultivos se realizaron con las mismas concentraciones del establecimiento, pero la hiperhidratación (HH) afectó su calidad. Los brotes generados en dos subcultivos consecutivos con 0.5 mg L⁻¹ de BAP, fueron subcultivados en concentraciones más bajas de BAP a 0, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mg L⁻¹ durante 30 días. Estos produjeron brotes sanos (BS) y brotes con HH inicial (BHHI). En estos el mayor número de brotes se generó en la concentración 1.5 mg L⁻¹ (SC3, 6.7 brotes) y en 0.5 mg L⁻¹ en promedio de todos (SC4, SC5 y SC5-1) los subcultivos se obtuvieron 9. Esta última concentración permitió la recuperación de BHHI y obtener 73 % de sobrevivencia y enraizamiento de propágulos madre.

Palabras clave: *Beaucarnea*, Nolinaceae, organogénesis directa, hiperhidratación, BAP, *in vitro*.

GENETIC RESCUE OF *Calibanus hookeri* (LEM.) TREL.

María del Rosario Chávez Muñoz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Calibanus hookeri synonymy *Beaucarnea hookeri*, endemic of Mexico and with category of risk threatened (NOM-059-SEMANARNAT-2010), its morphology that characterizes is its caudex, of fissured crust grayish brown color, leaves arranged in rosette almost sessile distributed in the caudex giving a caespitose appearance. It is found in very localized places and in populations with few individuals. So then, in view of this situation, the *in vitro* propagation is an option to satisfy the demand in horticultural market, but also to design reintroduction programs, contributing to its conservation. Protocols exist to propagate the genera *Beaucarnea*, *Dasyllirion*, *Nolina* and *C. hookeri* by direct organogenesis on MS medium supplemented with various cytokinins at high concentrations, but the subculture of this species they have not studied it. The objective of this work was to generate an *in vitro* subculture protocol for *C. hookeri* by direct organogenesis of *in vitro* germinated seed in MS basal medium supplemented with BAP ((2.5, 5 mg L⁻¹) and BAP+ANA (2.5, 5 + 0.1, 0.5 mg L⁻¹), and a control treatment without regulator growth, for each establishment. For subcultures, MS medium and whole shoots were used as propagule. The 4N sulfuric acid allowed to establish the seeds *in vitro* stored without previous treatment. A completely randomized experimental design was executed in all experiments. The first subcultures (SC) were carried out with the same concentration as in the establishment, but hyperhydration (HH) affected their quality. Subculture SC3 with BAP (0, 0.5, 1, 1.5 and 2.5 mg L⁻¹) produced healthy (HS) and hyperhydrated (HHS) shoots, and shoots subcultures (SC4, SC4-1, SC5, SC5-1) twice consecutively with 0.5 mg L⁻¹ BAP for 30 days. In the subcultures, the highest number of shoots was generated at 1.5 (SC3, 6.7 shoots) and 0.5 (SC4, 9.7; SC4-1, 6.19 and SC 5-1, 10.36 shoots for propagule) mg L⁻¹ BAP. This last concentration allowed the recovery of HHS and the highest percentage 73.3 of survival mother propagules rooted.

Key words: *Beaucarnea*, Nolinaceae, direct organogenesis, hyperhydration, BAP, *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

A dios por permitirme vivir y concluir este trabajo de investigación

A Santa María de Guadalupe, Emperatriz de América por darme fortaleza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgo, para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura.

Al Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez, al M.C. Alejandro Manzo González, al Ing. Ignacio Carrasco Sandoval y a la Ing. Luz María Páez Reyes por sus cartas de recomendación.

Al Dr. Guillermo Calderón Zavala, al Dr. Eduardo García Villanueva y al Dr. Sergio Humberto Chávez Franco por ser los primeros contactos del CP Campus Montecillos al entrevistarme para mi ingreso.

A mis profesores: Dr. Jorge D. Etchevers Barra, Dra. Claudia I. Hidalgo Moreno, Dra. Rosa María López Romero, Dra. Nadia Jiménez Peña, Dr. José Isabel Cortés Flores, Dr. Alfredo López Jiménez, Dra. Raquel Cano Medrano, Dra. Libia I. Trejo Téllez, Dr. Guillermo Calderón Zavala, Dra. María Teresa Colinas León, Dra. Y. Leticia Fernández Pavía, Dr. Héctor González Rosas[†], Dr. Ángel Villegas Monter, Dr. Gustavo Ramírez Valverde, por sus enseñanzas.

A mi consejero Dr. Gregorio Arellano Ostoia y asesores: Dra. Y. Leticia Fernández Pavía, M.C. Alfonso Muratalla Lúa y la Dra. María. de los Ángeles Rodríguez Elizalde por sus consejos personales, orientación atinada y revisión de este trabajo.

A la M.C. Bibiana Solís Martínez por su apoyo en el proyecto inicial de investigación, al Dr. Héctor González Rosas[†] ya que iniciamos con esta investigación en el laboratorio a su cargo; al M.C. César Núñez Coronado por sus consejos prácticos de desinfección de equipo y material de laboratorio, al Dr. Gustavo Ramírez Valverde por sus asesorías para

el análisis estadístico en RStudio; al Dr. Juan Manuel Romero Padilla por sus asesorías en regresión logística; al Ing. Baruc Martínez Guzmán por asesoría en gráficas de caja.

A la Lic. María del Carmen Padilla Pastrana, a Ma. del Rosario de Torres Ramírez por su atinada asesoría en trámites del área de Servicios Académicos, así como su staff de apoyo Berenice, Omar.

Al Lic. Nezahualcoyotl Ahmed Niño Membrillo y a su staff de apoyo Viviana Romero Deheza y José Luis Colín Badillo, por la atención en trámites de beca CONACYT.

A Sagrario Reyes Cuevas, a Fanny Elena. Sánchez Sánchez, a Cristina Monsalvo Sánchez, a Reyna Sánchez Meraz, a Verónica Juárez, a Valeria Vega Sánchez por su amable asesoría en trámites en la Coordinación de Fruticultura.

A Gerardo Pineda Sánchez por su atinada asesoría para cumplir con el formato tesis, a Francisco Javier Carrillo Hidalgo, María Isabel, Mariana y José Luis asesoría y proporcionar material didáctico en biblioteca.

A mi madre, Julia Muñoz Pérez[†], a mis hermanos: Marta, Elizabeth, Teresa, Celerino, a mi cuñado José León Cruz por su apoyo financiero y moral.

A mis suegros: Margarita Guzmán Huerta y Ranulfo Gregorio Martínez Rosas y a mi cuñada Gisela Martínez Guzmán por su apoyo moral.

A mis amigos y/o compañeros: Anahí Tochiuitl Martiñón, María Rafaela Hernández Escobar, Marcelina Vélez Torres, Liliana Arrazola Cárdenas, Oyuky Librado Cruz, Yuridia Pétriz Celaya, Olivia Sandoval Rosales, Sara García Huerta, Aminadab Pérez Hernández, Iraís García Vázquez, Sandra Castro, Rosalba Contreras, Guadalupe Montserrat Valencia Trejo, Jennifer Ivette Vargas Abonce, Norma B. Mendoza Hernández, Yasbet Ríos Barreto, Clara Anabel Arredondo Ramírez, María Serret López y M. Baruc Martínez Guzmán por compartir tiempo, apoyo, consejos y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres, Julia Muñoz Pérez[†] y Francisco Chávez Hernández[†].

A mi esposo, M. Baruc Martínez Guzmán

A mis hijos: Astrid Samantha, Baruc, Julia Jazmín, Jennifer Margarita y Carlos Samuel.

A mis hermanos: Teresa, Moisés[†], Mario, Francisco, Hortencia[†], Virginia[†], Marta, Lucia, Celerino, Elizabeth y Julia[†].

A mis sobrinos: Xavier, Nuria, Gaby, Moises[†], Everardo, Janet[†], Edgar, Francisco Javier, Ariana, Susana, Mario, Francisco, Miriam, Vianey, Itzel, Brenda, José de Jesús, Leonardo, Crescencio, Cristian, Brayan, Melisa, Ashly Rachel, Héctor Julian, Abigail Elizabeth, Ricardo Guadalupe.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTAS DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURAS.....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1. Objetivos de la investigación.....	3
2.1.1. Objetivo general.....	3
2.1.2. Objetivos particulares	3
2.2. Hipótesis	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1. <i>Calibanus hookeri</i>	5
3.2. Descripción botánica de <i>Calibanus</i>	6
3.3. Distribución de <i>Calibanus</i> en México	10
3.4. Conservación in-situ y ex-situ	10
3.5. Propagación	13
3.5.1. Propagación sexual	13
3.5.2. Propagación asexual	14
3.6. Propagación <i>in vitro</i> del género <i>Beaucarnea</i>	15
3.6.1. Organogénesis directa.....	15
3.6.2. Organogénesis indirecta	16
3.6.3. Embriogénesis somática directa	16
3.6.4. Embriogénesis somática indirecta	16
3.7. Protocolo de desinfestación semillas	16
3.8. Germinación <i>in vitro</i> semillas	18

3.9. Multiplicación <i>in vitro</i>	20
3.9.1. Hiperhidratación.....	20
3.9.2. Tipo de explante	22
3.9.3. Bencilaminopurina o benciladenina	23
3.9.4. Ácido naftalen-acético.....	24
3.9.5. Proporción citocinina/auxina	24
3.10. Condiciones de incubación	24
3.11. Etapa de enraizamiento	25
3.11.1. Ácido Indolbutírico	25
3.12. Acimatización	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. Ubicación del experimento.....	28
4.2. Material vegetal.....	28
4.3. Tratamientos	28
4.3.1 Medio de cultivo	28
4.3.2. Establecimiento.....	31
4.3.3. Subcultivo	33
4.3.4. Enraizamiento.....	34
4.3.5. Acimatización	35
4.4. Tratamientos	37
4.5. Diseño experimental	39
4.6. Variables evaluadas.....	40
4.6.1. Establecimiento.....	40
4.6.2. Multiplicación (subcultivos)	40
4.6.3. Enraizamiento y acimatización.....	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	43
5.1. Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas <i>C. hookeri</i> con BAP	43
5.2. Subcultivos con concentraciones de BAP.....	48
5.2.1 Primer subcultivo de brotes <i>C. hookeri</i>	48
5.2.2. Segundo subcultivo (SC2) de brotes de <i>C. hookeri</i>	50
5.2.3. Tercer subcultivo (SC3) de brotes <i>C. hookeri</i>	53

5.2.4. Cuarto subcultivo (SC4) de brotes sanos <i>C. hookeri</i>	56
5.2.5. Cuarto subcultivo de brotes de <i>C. hookeri</i> con HHI (SC4-1).....	59
5.2.6. Quinto subcultivo (SC5) de brotes <i>C. hookeri</i>	62
5.2.7. Subcultivo SC5-1 de brotes de <i>C. hookeri</i>	66
5.3. Enraizamiento y aclimatación de brotes madre (BM) <i>C. hookeri</i>	69
5.3.1. Enraizamiento <i>ex vitro</i> y aclimatación BM de <i>C. hookeri</i> SC2 en tubete	69
5.3.2. Enraizamiento <i>in vitro</i> AIB de brotes sanos de <i>C. hookeri</i> SC3	71
5.3.3. Inducción de raíz <i>in vitro</i> con AIB y aclimatización de brotes de <i>C. hookeri</i>	75
5.4. Establecimiento <i>in vitro</i> semillas <i>C. hookeri</i> con BAP-ANA.....	79
5.5. Subcultivos concentraciones BAP+ANA	85
5.5.1. Primer subcultivo brotes Calibanus BAP-ANA	85
5.5.2. Segundo subcultivo brotes de <i>C. hookeri</i> BAP + ANA.....	87
VI. CONCLUSIONES	90
VII. LITERATURA CITADA.....	91

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 3. 1. Medio de cultivo.....	19
Cuadro. 3. 2. Condiciones de incubación siembra de semillas <i>in vitro</i>	20
Cuadro. 4. 1. Material vegetal utilizado en la investigación de <i>C. hookeri</i> , propagación <i>in vitro</i> , Laboratorio de Embriogénesis, Colegio Postgraduados	29
Cuadro. 4. 2. Material vegetal utilizado en investigación de <i>C. hookeri</i> , propagación <i>in vitro</i> con BAP + ANA.	30
Cuadro.4.3. Material vegetal utilizado en la investigación de enraizamiento y aclimatización, Laboratorio de Embriogénesis, Colegio Postgraduados	30
Cuadro. 4. 4. Tratamientos en la propagación <i>in vitro</i> de <i>C. hookeri</i> , con concentraciones de BAP	37
Cuadro. 4. 5. Tratamientos en propagación <i>in vitro</i> de <i>C. hookeri</i> , en concentraciones BAP + ANA.....	38
Cuadro. 4. 6. Tratamientos de brotes madre de <i>C. hookeri</i> para el enraizamiento <i>ex vitro</i> y enraizamiento <i>in vitro</i> con AIB.....	38
Cuadro. 4 7. Tratamientos de brotes de <i>C. hookeri</i> para inducción de enraizamiento <i>in vitro</i>	39
Cuadro 5. 1. Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. hookeri</i> , porcentajes de contaminación, germinación, emergencia e hiperhidratación.....	44
Cuadro 5. 2. Respuesta a concentraciones de BAP en el establecimiento de semillas de <i>C. hookeri</i> <i>in vitro</i> en el número y la longitud de raíces.	44
Cuadro 5. 3. Respuesta a concentraciones de BAP en establecimiento de semillas de <i>C. hookeri in vitro</i> , longitud de hoja, ancho de hoja y número de brotes.	45
Cuadro 5. 4. Respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> a concentraciones de BAP en el primer subcultivo (SC1) a los 30 días de inicio.....	49
Cuadro 5. 5. Respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> a concentraciones de BAP en el segundo subcultivo (SC2)	51

Cuadro 5. 6. Respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> originados en 0.5 mg L ⁻¹ de BAP, expuestos a concentraciones de BAP del SC3 a 30 de iniciado	54
Cuadro 5. 7. Respuesta de brotes sanos de <i>C. hookeri</i> con origen SC3, subcultivados 30 días a concentraciones 0 y 0.5 mg L ⁻¹ BAP, SC4	57
Cuadro 5. 8. Respuesta en la recuperación de brotes con HHI origen del SC3,1.5, 2 y 2.5 mg L ⁻¹ de BAP y generación de brotes al día 30, subcultivo SC4-1.	60
Cuadro 5. 9. Respuesta a mg L ⁻¹ BAP en la recuperación de brotes de <i>Calibanus</i> a la HHI, evaluada a 5 y 30 días de subcultivo SC4-1.	61
Cuadro 5. 10. Respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> a 0.5 mg L ⁻¹ BAP, por segunda ocasión, con seguimiento origen de brotes del SC3, a 30 días de SC5.....	64
Cuadro 5. 11. SC5-1 respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> a mg L ⁻¹ de BAP, con origen de brotes en SC4.	67
Cuadro 5. 12. Respuesta a mg kg ⁻¹ de Radix 10000® en enraizamiento ex vitro y aclimatación en tubete de brotes de <i>C. hookeri</i> SC2, después de su primera producción de brotes, 80 días después del trasplante.	70
Cuadro 5. 13. Enraizamiento in vitro con AIB de brotes de <i>C. hookeri</i> durante 40 días, concentraciones 0.5 y 1 mg L ⁻¹ de BAP.....	72
Cuadro 5. 14. Supervivencia de brotes de <i>C. hookeri</i> con raíz al día 60 del trasplante, después de un proceso de inducción a enraizamiento in vitro con AIB.....	76
Cuadro 5. 15. Porcentaje de semillas de <i>C. hookeri</i> germinadas, emergidas y plántulas hiperhidratadas	79
Cuadro 5. 16. Respuesta de semillas de <i>C. hookeri</i> establecidas in vitro a BAP+ANA en número y longitud de raíz	81
Cuadro 5. 17. Respuesta de plántulas de <i>C. hookeri</i> generadas de semillas establecidas in vitro en concentraciones BAP+ANA, a la longitud de hoja y número brotes.	83
Cuadro 5. 18. Respuesta a altas concentraciones de BAP + ANA de brotes de <i>C. hookeri</i> en su primer subcultivo, SC1 al día 30.	86

Cuadro 5. 19. Respuesta a bajas concentraciones de BAP-ANA, brotes generados del subcultivo de planta madre en bajas concentraciones, durante 30 días de SC2.....	88
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3. 1.** *Calibanus hookeri*. A. Planta con varios fascículos, Hernández-Sandoval, (2019). 7
- Figura 3. 2.** A. aspecto de una parte de la planta entera; B. hoja; C. segmento de hoja; D. parte de inflorescencia; E. conjunto de flores estaminadas; F. Estambre. Ilustrado por W.H. Fitch y reproducido de Curtis's Botanical Magazine, 85, t.5099. 1859, lámina Hernández-Sandoval (2020)..... 7
- Figura 3. 3** Estructuras reproductivas de *Calibanus hookeri*. A. Flor estaminada, B. flor pistilada con detalle de un segmento de perianto. C. vista apical del gineceo: a. sección transversal cerca de la base del ovario, b, sección transversal en la base media y c, ápice; D. gineceo con detalle del estigma. E. semillas vistas lateral, apical (Rojas-Piña et al. 2014), sección transversal. F. fruto (Irekani, 2016). 9
- Figura 4. 1.** Proceso de desinfestación y siembra de semillas *C. hookeri*. A. lavado de semillas con solución detergente; B. semillas en solución con cloro y C. semillas sembradas. 32
- Figura 4. 2.** Brotes separados del brote propágulo para su subcultivo. A. brotes generados en SC1 con 5, 0.1 mg L⁻¹ BAP + ANA; B. 2.5, 0.5 mg L⁻¹ BAP + ANA a los 90 de establecidos; C. Material vegetal 2.5, 0.1 BAP + ANA para SC1. D. Brotes empleados en SC2 BAP..... 34
- Figura 5. 1.** Plantas de *C. hookeri* a 60 días de establecidas en BAP, brotes sanos e hiperhidratados. A. 2.5 mg L⁻¹ R9; B. 5 mg L⁻¹ R38; C. 5 mg L⁻¹ BAP R40; D. 0 mg L⁻¹ R8 brotes sanos; brotes hiperhidratados E. 5 mg L⁻¹ BAP R34 y F. 2.5 mg L⁻¹ R21; G. tratamientos BAP a los 30 días del establecimiento semillas in vitro de izquierda a derecha tratamiento 2.5, 5, 0 mg L⁻¹ BAP; H. tratamientos BAP a los 60 días del establecimiento semillas in vitro, de izquierda a derecha 0, 5, 2.5 mg L⁻¹..... 47
- Figura 5. 2.** Gráfica de cajas, número de brotes generados de *C. hookeri* a 70 días del establecimiento in vitro en concentraciones de BAP (mg L⁻¹)..... 48

Figura 5. 3. Gráfica de cajas, número de brotes generados de <i>C. hookeri</i> a 30 días (SC1) en respuesta a diferentes concentraciones de BAP (mg L^{-1}).	49
Figura 5. 4. Plantas afectadas por hiperhidratación a los 30 días, SC1. A. Propágulos del tratamiento 2.5 mg L^{-1} BAP; B. 5 mg L^{-1} BAP.....	50
Figura 5. 5. Gráfica de cajas, respuesta de brotes a (mg L^{-1}) BAP, número de brotes generados de <i>C. hookeri</i> a los 40 días, SC2.....	52
Figura 5. 6. Propágulos del SC2 en medio suplementado con BAP a los 30 días. A. 0.5 mg L^{-1} propágulo y brotes, verde intenso; B. misma concentración que A, propágulos y brotes verdes claro; C. 1 mg L^{-1} BAP propágulo y brotes sanos de tamaño similar color verde ligeramente claro y D. misma concentración que C, pero con ligera hiperhidratación base de tallos anchos y hojas con coloración verde claro.....	53
Figura 5. 7. Gráfica de cajas, número de brotes generados de <i>C. hookeri</i> a 30 días (SC3) en respuesta a diferentes concentraciones de BAP (mg L^{-1}).	55
Figura 5. 8. Propágulos a 30 días de subcultivo, SC3. A. R20 de izquierda a derecha 0, 1, 0.5, 2, 1.5, 2.5 mg L^{-1} BAP; B. R 14 de izquierda a derecha 0, 1, 1.5, 2.5 mg L^{-1} BAP.	56
Figura 5. 9. Brotes generados en SC4 con una concentración de 0.5 mg L^{-1} de BAP asociado al origen de brote (OB). A. R18 de izquierda a derecha tratamientos 0, 2.5, 0.5, 1.5, 2, 1 mg L^{-1} BAP; B. 0.5 mg L^{-1} BAP; C. OB 1 mg L^{-1} BAP; D. OB 1.5 mg L^{-1} BAP; E. OB 2.5 mg L^{-1} BAP.....	58
Figura 5. 10. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes sanos de <i>C. hookeri</i> a 30 días (SC4) en respuesta a 0.5 mg L^{-1} de BAP.....	59
Figura 5. 11. Gráfica de cajas, respuesta de brotes de <i>C. hookeri</i> con sobrehidratación (HHI) a la generación de brotes en concentraciones de BAP (mg L^{-1}) 30 días de SC4-1.....	61
Figura 5. 12. Brotes propágulo y tratamientos del SC4-1. A. Brotes establecidos con hiperhidratación inicial (HHI) a 0, 0.5 y 1 mg L^{-1} . B. brotes recuperados de la hiperhidratación inicial de izquierda a derecha 0, 0.5 y 1 mg L^{-1} . C. Los tratamientos de izquierda a derecha 0, 0.5 y 1 mg L^{-1} , el testigo sin raíz, menor cantidad de hojas y altura. D. tratamiento 0 mg L^{-1}	

¹ BAP, lado izquierdo no logró recuperarse de HHI. E. tratamientos de izquierda derecha 0, 1, 0.5, mejor tratamiento 0.5 mg L ⁻¹ en la recuperación de HHI.	62
Figura 5. 13. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes de <i>C. hookeri</i> a 30 días (SC5) en respuesta a 0.5 mg L ⁻¹ de BAP.	64
Figura 5. 14. Tratamientos del SC5, propágulos origen de brote (OB) mg L ⁻¹ BAP colocados en medio suplementado con 0.5 y 0 mg L ⁻¹ de BAP al día 30. A y A' OB 0.5; B. OB 1; C y C'. OB 1.5; D. OB 2; E. OB 2.5; F y F'. 0.5 (testigo).	65
Figura 5. 15. Tratamientos del SC5-1, Aspecto al día 30 de subcultivo, los propágulo tuvieron de 2 cm aprox. de LH cuando se establecieron. A. tratamientos R16 de izquierda a derecha 1, 0.5 y 0 mg L ⁻¹ BAP; B. tratamientos R24 de izquierda a derecha 0.5, 0, 1 mg L ⁻¹ , C. 0 mg L ⁻¹ muestra un brote con raíz y otro no logró enraizar; D. vista general de experimento SC5-1.	68
Figura 5. 16. Gráfica de cajas, respuesta de brotes a (mg L ⁻¹) BAP, número de brotes de <i>C. hookeri</i> al día 30 SC5-1.	69
Figura 5. 17. Enraizamiento ex vitro y aclimatización de brotes de <i>C. hookeri</i> con concentraciones (mg.kg ⁻¹) de Radix 10000 ® en tubete a 80 días del trasplante A. y B. charolas con tubetes del experimento. C. 1000 mg kg ⁻¹ R5; D. 2000 mg kg ⁻¹ R10; E. 0 mg kg ⁻¹ R6 F. 4000 mg kg ⁻¹ R12.	71
Figura 5. 18. Enraizamiento in vitro de brotes que previamente generaron brotes, en un medio MS suplementado con AIB al día 40. A. R2, de izquierda a derecha (0.1, 0, 0.5 y 0.25 mg L ⁻¹). B. R13, de izquierda a derecha (0.25, 0.5, 0.1 y 0 mg L ⁻¹).	74
Figura 5. 19. Tratamientos inducción in vitro de enraizamiento en medio semisólido durante 48 h, enraizamiento de brotes y aclimatación ex vitro, que presentaron raíces a los 60 días después del trasplante. A: TT2CP; B: T2R4; C: T6R2; D: T7R2; E: TTC10; F: T14R2; G: T17R3; H: TTC07.	77
Figura 5. 20. Tratamientos inducción in vitro de enraizamiento y aclimatación de brotes que no formaron raíces a los 60 días después del trasplante. A:	

T1R1; B: T5R2; C: T9R3; D: T11R3; E: T12R2; F: T13R2; G: T8R1 Y H: T19R4.....	78
Figura 5. 21. Semillas, plántulas a 40 y 60 días después de establecidas in vitro en medio suplementado con BAP+ANA. A. Semillas 20 días después de establecidas de izquierda a derecha tratamientos 5,0.5; 0,0; 5,0.1; 2.5,0.5 mg L ⁻¹ ; B y C. Variación en la emergencia 40 dde; B. tratamientos de izquierda a derecha 0,0; 5,0.5; 5,0.5; 2.5,0.5 mg L ⁻¹ ; C. 5,0.5; 0,0; 5,0.1; 2.5,0.5 mg L ⁻¹ . Plántulas a 60 dde D.2.5,0.1; E.2.5,0.5; F.5,0.1 G.5,0.5; H.0,0 mg L ⁻¹	82
Figura 5. 22. Gráfica de cajas, número de brotes al día 60 de plántulas germinadas in vitro en concentraciones BAP+ANA.	83
Figura 5. 23. Plántulas inducidas con BAP+ANA brotes generados de forma característica de acuerdo a la combinación 90 días después de establecidas. A. tratamiento 2.5,0.1; B. 2.5,0.5; C. 5,0.1 y D.5,0.5 mg L ⁻¹ . Plantas hiperhidratadas al día 90, después de semillas establecidas in vitro con BAP+ANA. E. tratamiento 5,0.5; F. 2.5,0.5 mg L ⁻¹ , G: izquierda 2.5, 0.1 mg L ⁻¹ y derecha 5, 0.1 mg L ⁻¹ ; H. 0 mg L ⁻¹ (testigo); I. Tratamiento 2.5,0.1 mg L ⁻¹ , planta con color verde claro y patrón de formación de brotes en la base del tallo hacia abajo a 55 dde.....	84
Figura 5. 24. A. raíces de plántulas generadas in vitro 6 meses después de trasplante y aclimatización. B. formación de caudex 6 m después de trasplante; C. planta con hijuelo desde aclimatización.....	84
Figura 5. 25. Gráfica de cajas, número de brotes generados de <i>C. hookeri</i> al día 30 (SC1) en respuesta concentraciones de BAP + ANA (mg L ⁻¹).	86
Figura 5. 26. Respuesta de brotes al SC1 30 día después de establecidos en BAP+ANA. A. tratamiento 2.5, 0.1; B. 2.5, 0.5; C.5, 0.1; D: 5, 0.5 mg L ⁻¹	87
Figura 5. 27. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes de <i>C. hookeri</i> al día 30 (SC1) en respuesta concentraciones de BAP + ANA (mg L ⁻¹)......	89

Figura 5. 28. Propágulos sanos con brotes a 30 días de SC2, de izquierda a derecha Tratamientos A. 0.5,0.02; B. 0.5,0.1; C. 1,0.02; D. 1,0.1; E. 0 mg L⁻¹ BAP+ANA..... 89

ABREVIATURAS

ABT	ancho de base tallo
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenácetico
BAP	bencilaminopurina
FG	frasco gerber
H	hora
HHI	hiperhidratación inicial
LH	longitud de hoja más larga
LR	longitud de raíz más larga
$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	micromol por metro cuadrado por segundo
mg kg^{-1}	miligramos por kilogramo
NB	número de brotes
NR	número de raíces primarias
RCP	reguladores de crecimiento de plantas
S	supervivencia
SCR	supervivencia con raíz
T1	tratamiento uno
TT	testigo

I. INTRODUCCIÓN

Calibanus hookeri (Lem.) Baker. Sinonimia de *Beaucarnea hookeri* (SEMARNAT-2010) pertenece al orden de los Asparagales, familia Nolinaceae. Su nombre se deriva de Sir William J. Hooker (1785-1865) botánico británico. Es una especie endémica de México de zonas áridas y semiáridas reportada en los municipios de Zimapán estado de Hidalgo, San Luis de la Paz del estado de Guanajuato y del estado de San Luis Potosí (Piña *et al.*, 2014). Comparte características morfológicas con el género *Beaucarnea hookeri* por lo que al género *Calibanus hookeri* lo han considerado como un sinónimo después de los trabajos de investigación de filogenética molecular y morfología realizados por Piña *et al.*, (2014). La belleza de ésta especie, la adquiere con el paso de los años por su característico caudex que le da un valor comercial, lo que propicia el saqueo de esta especie de su hábitat natural. Ante esta situación, las técnicas de propagación *in vitro* hacen posible la multiplicación de dicha especie amenazada, declarada en la norma NOM-059 (SEMARNAT, 2010). Por lo que dentro de las primeras acciones de solución de este problema, es establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* mediante organogénesis directa, de semillas establecidas con concentraciones BAP, y posteriormente es necesaria la participación del gobierno municipal de los estados de origen, para que esta especie sea reestablecida en su hábitat natural, una vez establecida es preciso un control más estricto en los sistemas de manejo o saqueo de material biológico en poblaciones silvestres lo que evitará la extinción de la especie (Guillen *et al.*, 2015).

1.1. Planteamiento del problema

La especie *C. hookeri* es una especie en riesgo que se encuentra en la categoría “A” amenazada, desde el 2010, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones en la NOM-059 (SEMARNAT, 2010). Esta especie es endémica de México y se distribuye en los estados de Hidalgo, Guanajuato y San Luis Potosí.

Las funciones de las especies endémicas en condiciones semiáridas, principalmente se relacionan con la conservación de los suelos, fauna y la recarga de mantos acuíferos; en este caso, esta especie ha evolucionado y ha creado un órgano “caudex” (órgano de almacenamiento de agua). Sin embargo, las plantas con mayor acumulación resultan atractivas representando un valor comercial a quienes saquean esta flora. Una alternativa constituye repoblar con especies propagadas mediante propagación *in vitro* como se ha hecho en géneros de la familia Nolinaceae y en específico con *B. inermis* donde se han alcanzado porcentajes de sobrevivencia mayores a 90 % en invernadero. Sin embargo, aún sigue pendiente el protocolo de propagación *in vitro* mediante subcultivo, enraizamiento y aclimatación de los brotes generados mediante subcultivo para la especie *C. hookeri*, motivo por el cual se plantea que mediante organogénesis directa la obtención plantas y aclimatación en sala incubación. Se plantea que los propágulos (brotes completos) y semilla (después de germinar) tengan la capacidad de generar brotes, en medio basal MS con concentraciones de BAP.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Embriogénesis Somática del área de Fruticultura, del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. La investigación inició en el mes de agosto de 2020 y concluyó en diciembre del 2021. La especie con la que se trabajó fue *C. hookeri* con organogénesis directa, en cada fase se utilizaron concentraciones de BAP para organogénesis.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivos de la investigación

2.1.1. Objetivo general

Generar un protocolo para la propagación *in vitro* de *C. hookeri* mediante organogénesis directa de explantes mediante el establecimiento de semillas y evaluar los subcultivos subsecuentes de brotes generados.

2.1.2. Objetivos particulares

Evaluar la formación de brotes en concentraciones de 0, 2.5 y 5.0 mg L⁻¹ de BAP en plántulas obtenidas de la germinación de semillas, así como en el subcultivo de brotes generados a estas mismas concentraciones.

Evaluar la formación de brotes en concentraciones de 2.5 y 5.0 mg L⁻¹ de BAP más 0.1, 0.5 de ANA mg L⁻¹ y un testigo, en plántulas obtenidas de germinación *in vitro*.

Evaluar concentraciones bajas de BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2.0 y 2. mg L⁻¹), en subcultivos subsecuentes de brotes de Calibanus, para la generación de brotes sanos.

Evaluar el enraizamiento *in vitro* de brotes generados en la primera generación con concentraciones bajas de AIB (0, 0.1, 0.25 y 0.5 mg L⁻¹) a los de 40 días de establecer en medio de enraizamiento.

Determinar la capacidad de respuesta de brotes madre a formar raíces en condiciones *ex vitro* con 0, 1000, 2000 y 4000 mg Kg⁻¹ de Radix 10000 ® y su supervivencia y aclimatización en tubetes, 80 días después del trasplante.

Evaluar la Inducción de raíces *in vitro* con tres factores de estudio: 1) concentraciones 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de AIB, 2) el origen de los brotes en multiplicación 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg L⁻¹ de BAP y 3) el tratamiento al trasplante con fungicida más un coadyuvante durante la aclimatización durante 60 días.

2.2. Hipótesis

Concentraciones mayores a 2 mg L⁻¹ de BAP en el medio de cultivo en las etapas de establecimiento y multiplicación, afectan el número, la calidad y el enraizamiento de los brotes generados *in vitro* de *Calibanus hookeri*, al aumentar el número de brotes hiperhidratados y disminuir la tasa de multiplicación y/o enraizamiento en la fase de aclimatización *ex vitro*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. *Calibanus hookeri*

Calibanus hookeri (Lem) Trel. 1911 ha sido identificada en diferentes momentos como: *Dasyilirion hookeri* Lem, 1959., *D. hartwegianum* Hook, 1959., *D. cespitosum* Sheidw, 1861., *Calibanus caespitosus* Rose, 1906. y *Beaucarnea. hookeri* Baker, 1872 (DOF, 13/08/2018). Uno de los nombres comunes con los que se conoce es “sacamecate” (Golubou *et al.*, 2007); éste nombre común también está asociado a su apariencia de pasto. Las hojas contienen una substancia jabonosa y son usadas por la gente del campo como estropajo, para lavar los trastes en la región de San Miguel Allende, Guanajuato.

En México podemos encontrar representada y clasificada la especie de *C. hookeri*, en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) con cuatro especímenes y en el Herbario Nacional de México (MEXU) se tienen 18 especímenes, (García Mendoza y Galván Villanueva, 1995).

En un estudio filogenético a nivel molecular y morfológico, el género *Calibanus* mostró características morfológicas importantes con *Beaucarnea* (incluyen a *Calibanus*) Rojas-Piña *et al.* (2014), mostraron la ausencia de monofilía recíproca entre *Beaucarnea*, encontrando inmersión de *Calibanus* en *Beaucarnea*.

Estudios de anatomía de la hoja, el polen y la citología de plantas maduras y plántulas de *C. hookeri* se han investigado y comparado con las de *Nolina*, *Dasyilirion* y *Agave* spp., confirmaron la estrecha relación de *Calibanus* con *Nolina*, *Dasyilirion* y la disimilitud con agave (Jhonson Margaret. y Gale Rowena ,1983).

A continuación, se describen algunas características morfológicas que identifican a *B. hookeri* como sinonimia de *Calibanus hookeri*:

- Papilas foliares presentes
- Hábito caudiciforme, plantas de 1 m o menos de altura; segmentos del perianto púrpura

- Tallos generalmente subterráneos; hojas en fascículos esparcidos en la superficie superior del tallo (figura 2.1. a), 0.5 cm o menos de ancho

3.2. Descripción botánica de *Calibanus*

Beaucarnea hookeri (Lem.) Baker, 1872 como se ha publicado (DOF, 13/08/2018), es una especie endémica de México, el nombre de su especie no es definitivo requiere de más estudios o análisis para su validación (Hernández-Sandoval, 2019). Pertenece a:

Reino Plantae Haeckel, 1866.

División *Magnoliophyta* Cronquist, Takhtajan et Zimmermann, 1966.

Clase *Monocotyledoneae* DC., 1817.

Superorden *Liliflorae* Agardh, 1825.

Orden *Asparagales* Link, 1829.

Familia *Nolinaceae* Nakai, 1943.

La familia *Nolinaceae* Nakai, 1943, está formada por 3 géneros (*Beaucarnea* Lem. 1861., *Dasyilirion* Zucc.1940 y *Nolina* Michx, 1803), 56 especies y cuatro variedades (Hernández- Sandoval, 2019). Algunas de las características gruesas que definen a las *Nolinaceae* es que las semillas no tienen fitomelano, inflorescencias poligamodioicas, flores pequeñas, unisexuales y lóculos del fruto con 1-2 (-6) óvulos (García-Mendoza y Galván, 1995).

En el género *Beaucarnea* existen 13 especies en México, donde se incluye a *Calibanus* y otras dos especies nuevas (Hernández-Sandoval, 2019).

Hojas dispuestas en roseta casi sésiles distribuidas en el caudex dando una apariencia cespitosa (figura 3.2.A), hojas con láminas cóncavas de 90 a 95 cm de largo, de 1 a 2.5 mm de ancho a la mitad (figura 3.2.B), ápices cuadrangulados a poligonales, márgenes denticulados (figura 3.2.C) (Hernández-Sandoval, 2020). Jhonson Margaret y Gale

Rowena (1983) determinaron que las hojas están encerradas en cutícula gruesa, con grandes áreas de esclerénquima, se cree permiten la protección contra el marchitamiento excesivo.



Figura 3. 1. *Calibanus hookeri*. A. Planta con varios fascículos, Hernández-Sandoval, (2019).

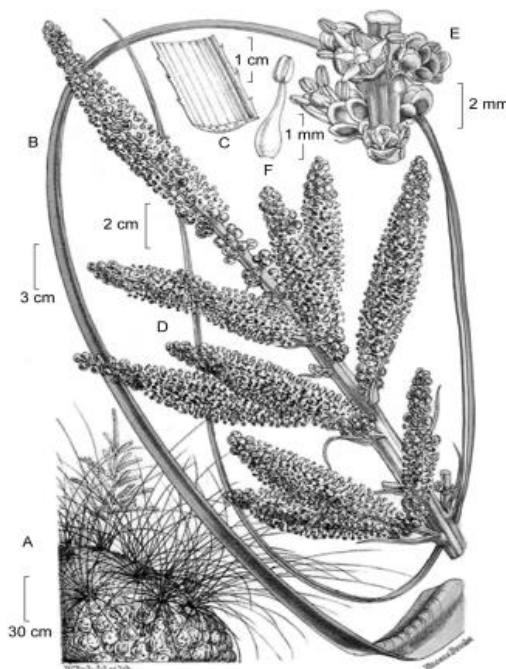


Figura 3. 2. A. aspecto de una parte de la planta entera; B. hoja; C. segmento de hoja; D. parte de inflorescencia; E. conjunto de flores estaminadas; F. Estambre. Ilustrado por W.H. Fitch y reproducido de Curtis's Botanical Magazine, 85, t.5099. 1859, lámina Hernández-Sandoval (2020).

La inflorescencia tiene tiras primarias, secundaria y a veces terciarias, la última unidad es un ripidio reducido (figura 3.2.D).

Presenta pequeñas flores hermafroditas (figura 3.3.B) que generalmente tienen un sexo funcional, son trímeros, actinomórficos e hipogíneo con seis segmentos periantos imbrincados que son a veces reflejados en la antítesis en las flores estaminadas. En las flores estaminadas (figura 3.3.A) el pistiloide es principalmente discreto, los segmentos del perianto son crenulados. El gineceo es sincarpo, carnosos y lisos, paredes gruesas y carece de alas (figura 3.3.C.a.b.c), (Rojas-Piña *et al.*, 2014).

El ovario es unilocular con paredes septales fusionadas basalmente y algunas veces permanece bien desarrollado a lo largo del ovario, pero nunca fusionado. La placentación es basal y axilar, el estilo es corto a ligeramente elongado carnosos y tiene un estigma tribulado papilado (figura 3.3. D), (Rojas-Piña *et al.*, 2014).

Las semillas son trilobuladas y principalmente únicas. El embrión es cilíndrico (figura 3.3.E), (Rojas-Piña *et al.*, 2014).

El fruto es una cápsula con dehiscencia retrasada, carece de alas, cada carpelo lleva una cresta longitudinal medialmente, es unilocular, (Rojas –Piña *et al.* 2014). Fruto de 5 mm de diámetro (figura 3.3.F), (IREKI, 2016).

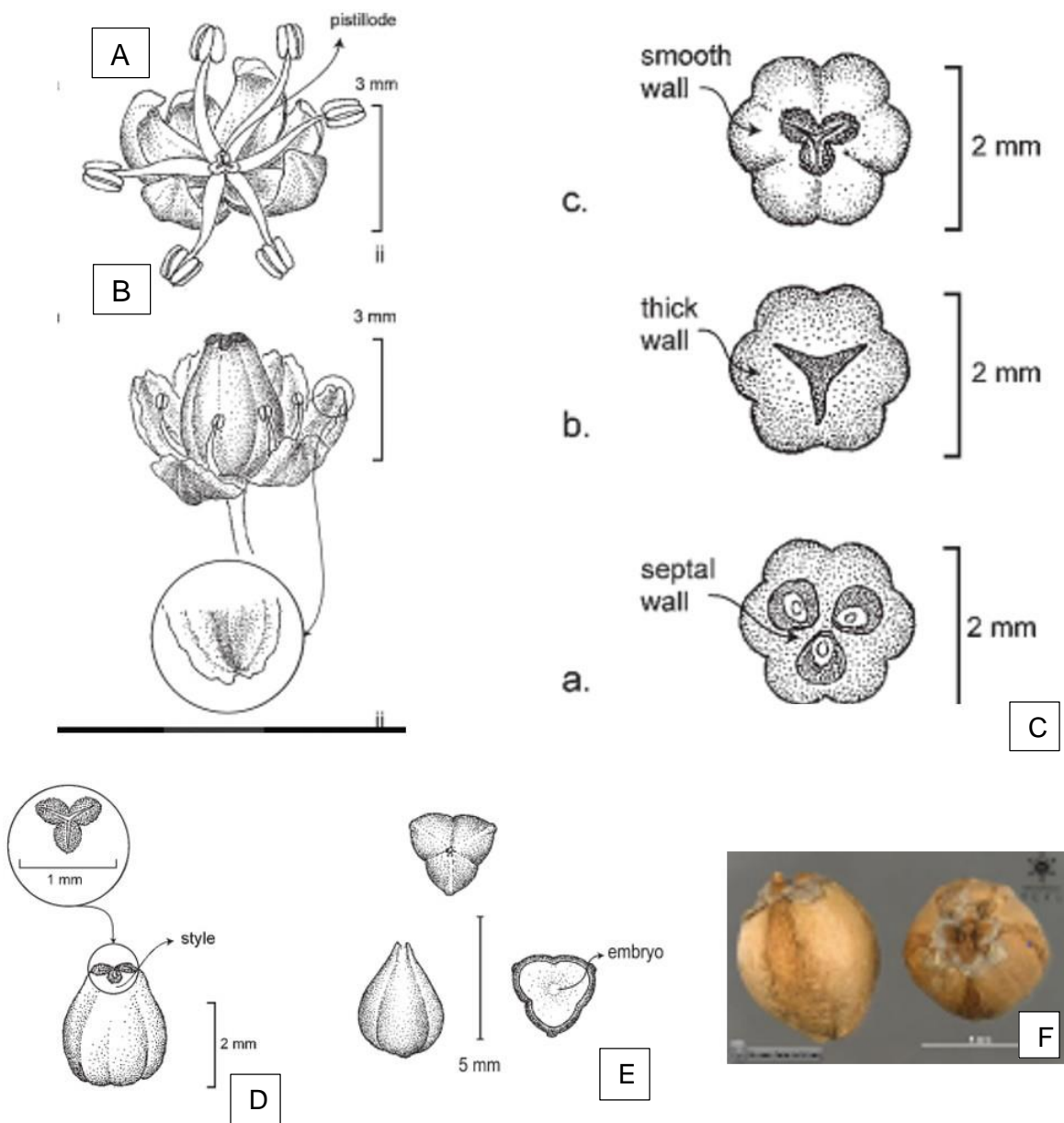


Figura 3. 3 Estructuras reproductivas de *Calibanus hookeri*. A. Flor estaminada, B. flor pistilada con detalle de un segmento de perianto. C. vista apical del gineceo: a. sección transversal cerca de la base del ovario, b. sección transversal en la base media y c, ápice; D. gineceo con detalle del estigma. E. semillas vistas lateral, apical (Rojas-Piña et al. 2014), sección transversal. F. fruto (Irekani, 2016).

3.3. Distribución de *Calibanus* en México

Especie endémica a México. Hernández- Sandoval (2020) lo reporta en los estados de Tamps., S. L. P., Gto., Qro. e Hgo. (Lectotipo de origen desconocido, proveniente de una planta cultivada en Europa: Royal Botanical garden, Kew, cactus house, 1873). En su trabajo en la Región del Bajío y áreas adyacentes lo describe como un elemento poco frecuente que crece en los estados de Guanajuato, en los municipios de León y Santa Catarina y en el estado de Querétaro en los municipios de Tolimán, Cadereyta y Ezequiel Montes, en los sitios de estos municipios en afloramientos de rocas ígneas, rara vez sobre rocas calizas. Las plantas se han localizado en altitudes de 1600 a 2550 msnm. Las flores de éstas se han colectado en flor entre abril, julio y en fruto hasta septiembre. La especie se encuentra en lugares muy localizados y en poblaciones con pocos individuos, por lo que Hernández –Sandoval (2020) sugiere debe de considerarse como amenazada de extinción.

Rojas-Piña *et al.* (2014). Indican que *C. hookeri* se ubica en los municipios de Zimapán, del estado de Hidalgo, San Luis de la Paz del estado de Guanajuato y en el estado de San Luis Potosí; De-Nova *et al.* (2018), reportaron a *C. hookeri* en el cerro de San Pedro y en Villa de Reyes, en San Luis Potosí.

3.4. Conservación in-situ y ex-situ

Se han establecido tanto en el ámbito nacional como internacional diversas estrategias de conservación agrupadas en dos grandes categorías: *in-situ* y *ex-situ* (Franco-Martínez, 1995).

El conocimiento que se tiene sobre la biología básica de la mayoría de las nolináceas es en términos generales es casi nulo, de ahí la importancia de intensificar más estudios ecofisiológicos que conlleven a comprender el papel en los ecosistemas y procesos que favorecen su mantenimiento bajo condiciones naturales (Golubov *et al.*, 2007).

Entre los problemas antropogénicos que afectan la conservación de la familia Nolinaceae figuran a) La destrucción y/o modificación de los hábitats que son causados por la

expansión agrícola, forestal y ganadera, así como también el sobrepastoreo, la expansión de áreas urbanas y la apertura de vías de comunicación. b) Uso no sustentable de alguna especie y c) colecta excesiva (Golubov *et al.*, 2007).

Es común observar algunas especies de *Beaucarnea* en venta que han sido extraídas de campo, así mismo, es común ver en numerosos sitios de internet que se ofrecen plantas y germoplasma de nolináceas mexicanas que fueron extraídas de México (Golubov *et al.*, 2007).

Conservación *in-situ*

Dentro de las estrategias de conservación *in-situ* para México informó Franco-Martínez (1995), existen las áreas protegidas. En 1983 se estableció el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SINAP). La clasificación SINAP está basada en los objetivos de la conservación, extensión territorial y los programas de manejo.

De las 89 Áreas Naturales Protegidas decretadas en 30 de ellas existe alguna especie de las familias Agavaceae y Nolinaceae. Éstas se encuentran distribuidas en ocho Reservas de la Biosfera, cuatro Reservas Especiales de la Biosfera, catorce Parques Nacionales, un Monumento Natural y dos Áreas de Protección de Flora y Fauna Silvestres y acuáticas (Franco-Martínez, 1995).

Las Áreas Protegidas más importantes por ubicación geográfica, superficie y riqueza biológica en Agavaceae y Nolinaceae se encuentran en la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno en Baja California Sur, la Reserva de la Biosfera El Cielo en Tamaulipas y la del Valle de Tehuacán-Cuicatlán en los estados de Tehuacán y Oaxaca (Franco-Martínez, 1995).

Conservación *ex-situ*

Para México las estrategias de conservación *ex-situ* contemplan a los bancos de germoplasma, jardines botánicos y viveros. Una de las modalidades más utilizada para

conservar material vegetal de especies silvestres es el Banco de Semillas o *Index Seminum* (Franco- Martínez, 1995).

Los jardines botánicos son unidades destinadas a la conservación y el cultivo de plantas con un fin científico, se complementan con investigación, educación y difusión (Franco-Martínez, 1995).

De los 38 jardines botánicos registrados, 22 de ellos incluyen en sus colecciones al menos un taxón de las familias Agavaceae y Nolinaceae. Así mismo existen 8 viveros comerciales que han iniciado la reproducción artificial por semillas e hijuelos de 12 especies, sólo uno de ellos propaga la especie *Calibanus* (Franco-Martínez, 1995).

Actualmente CONABIO (2022) en su página oficial tiene registrados 22 jardines botánicos que son pieza clave para la conservación de las especies vegetales que se encuentran en alguna de las categorías de riesgo de la NOM-059-SEMARNAT-2010, así como aquellas incluidas en la lista roja de la UICN y en los distintos apéndices de CITES.

De acuerdo con la CONABIO (2022) la especie *C. hookeri* se encuentra registrada en categoría de riesgo “amenazada” en 4 de los 22 jardines botánicos los cuales son: Jardín Botánico de Cadereyta, ubicado en el estado de Querétaro municipio Cadereyta de Montes; Jardín Botánico El Charco del Ingenio, ubicado en el estado de Guanajuato, municipio San Miguel de Allende; Jardín Botánico de la FESC-UNAM ubicado en el Estado de México, municipio Teoloyucan y Jardín Botánico del IB-UNAM de la Ciudad de México municipio Coyoacán.

En el Jardín botánico Iztacala, UNAM, García-Pineda (2019) reporta que han desarrollado un programa de propagación sexual y asexual. de *C. hookeri* lo han propagado por semilla. Para germinar las semillas de varias especies en alguna categoría de riesgo se han creado un protocolo de desinfestación que consiste en que a plántulas de dos semanas de emergidas (1 a 2 cm de longitud), se han aclimatizado con una intensidad lumínica de 60 a 80 lux en invernadero. Los riegos los han realizado cada 15 días. Debido a que la gran mayoría de las plantas suculentas que se propagan se adaptan rápidamente a las condiciones de cultivo, la comercialización constituye una

alternativa de conservación ya que de esta manera se evitará el saqueo en las poblaciones silvestres.

3.5. Propagación

La propagación de *C. hookeri* y géneros que integran la familia Nolinaceae ha sido mediante semillas en condiciones ex vitro (Castillo-Quiroz *et al.*, 2018; Flores *et al.*, 2019; Johnson Margaret y Gale Rowena, 1983; Rodríguez Trejo *et al.*, 2019; Rosa *et al.*, 2014;), así como también se ha realizado por semilla para el establecimiento *in vitro* (Flores García *et al.*, 2009; Guillen *et al.*, 2015; Núñez *et al.*, 2021; Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005; Reyes Silva *et al.*, 2013; Vadillo-Pro *et al.*, 2016).

3.5.1. Propagación sexual

Los trabajos de anatomía y propagación realizados por Jhonson Margaret y Gale Rowena (1983) en *C. hookeri* (Lem.) Trelease, mostraron que esta especie, florecen aproximadamente veinte años. En relación a la polinización cruzada artificial, no mostró ninguna dificultad y consistió en el espolvoreado del polen sobre flores maduras femeninas. El uso de polen refrigerado entre 5 y 6 °C de un año de almacenamiento, fue exitoso. Además, se observó que en un lapso de 2 meses aprox. tardó de polinización a madurez de fruto.

En cuanto a la propagación sexual de *C. hookeri*, Jhonson Margaret y Gale Rowena (1983) reportaron que después de probar siembra de frutos completos en peatmoss, cajas Petri se obtuvo 12 y 18% de germinación durante 3 meses, la eliminación del pericarpio en el fruto tuvo poco efecto y el mejor tratamiento fue semillas sin pericarpio y testa en la región de la radícula las que generaron 100% de germinación en 48 h.

En *Beucarnea recurvata* Lem., Rosa *et al.* (2014). reportaron el más alto porcentaje (60%) e índice de velocidad de emergencia (0.95) obtenido de la siembra de semillas sin pericarpio y los valores más altos de materia seca total y diámetro de tallo fue observada en plántulas cultivadas en sustrato compuesto de suelo Haplustox típico, arena gruesa y polvo de carbón. En un segundo experimento semillas con pericarpio almacenadas por un año bajo condiciones ambientales y posterior remoción de su pericarpio no se observó

efecto de tratamiento pre-germinativo en porcentaje de emergencia y el valor más alto del índice de velocidad de emergencia (1.75) fue observado cuando las semillas se mantuvieron en inmersión en agua durante 96 h.

Las semillas del cortadillo (*Nolina Cespitifera* Trel.) se caracterizan por presentar latencia combinada exógena y endógena que impiden el paso del agua, lo que inhibe el proceso de germinación. Después realizar un experimento de cinco tratamientos, el mejor tratamiento fue emplear hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % (v/v) durante 8 minutos donde se registró el 49.33 % de germinación (Castillo-Quiroz *et al.*, 2018).

Al estudiar el efecto de remoción del fruto, dos regímenes térmicos de *Dasyllirion lucidum* y *Beaucarnea gracilis*. y la edad de la semilla en *B. gracilis*. Rodríguez Trejo *et al.* (2019) determinaron que la germinación de *D. lucidum* fue afectada por la remoción*temperatura, la que alcanzó 95.8% a 20/17 °C sin fruto. En *B. gracilis* fue influida por la remoción sin fruto y alcanzó una media de 89.3 % con semilla fresca o de un año, 30 o 25/20 °C sin diferencia de edad y temperatura.

La presencia de organismos patógenos en las semillas de *Nolina parviflora* disminuyen el desarrollo de plántulas durante su producción en vivero, incrementan las tasas de mortalidad en el proceso de germinación. Flores *et al.* (2019) demostraron que el mejor tratamiento de desinfección de semilla en *N. parviflora* se obtuvo con peróxido de hidrogeno al 3% (v/v) en agitación por 24 horas comparado con hipoclorito de sodio (3% v/v) y etanol (70% v/v).

3.5.2. Propagación asexual

La propagación asexual de *C. hookeri* y géneros integrantes de la familia Nolinaceae se han reportado a partir de plántulas germinadas *in vitro*, para generar brotes múltiples y segmentos de tallo (0.7 y 1 cm) para *Nolina parviflora* (Flores García, *et al.*, 2009), plántulas con raíz y hojas recortadas en dos secciones longitudinales por plántula para *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata*; *B. purpusii* (Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005; Vadillo-Pro *et al.*, 2016)., explantes basales de 10 a 15 mm, sin hojas, ni raíces para *Beaucarnea goldmanii*, *B. gracilis*, *B. recurvata*, *Dasyllirion leophyllum*, *D. longissimum*,

D. lucidum, *D. serratifolium*, *Nolina duranguensis*, *Nolina longifolia*, *Nolina parviflora* (Reyes Silva *et al.*, 2013).

3.6. Propagación *in vitro* del género *Beaucarnea*

3.6.1. Organogénesis directa

La propagación asexual de *C. hookeri* y géneros integrantes de la familia Nolinaceae se reportan a partir de plántulas germinadas *in vitro*, para generar brotes múltiples. El desarrollo directo de yemas preexistentes puede ser una ruta para el rescate de genotipos de especies dañadas (Martínez- Palacios *et al.*, 2003).

Plántulas de 7 cm con raíz y hojas recortadas en medio Murashige y Skoog suplementado con 22.2 (5.0 mg L⁻¹) μM BA generaron 5.4 brotes por plántula en *B. gracilis*, a 13.2 μM (3 mg L⁻¹) generó 1.5 brotes por explante y con 4.4 μM (1 mg L⁻¹) BA generó 1.9 brotes por explante en *B. recurvata*. Éste mismo explante, pero cortado en dos secciones longitudinales para *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata* en medio Murashige y Skoog suplementado con 22.2 μM 6-bencilaminopurina indujo 8.2 y 11.1 brotes por explante (Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005).

Explantes basales de 10 a 15 mm, sin hojas, ni raíces en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con BA fue de los mejores tratamientos (3 y 4 mg L⁻¹) para las especies *Beaucarnea goldmanii*, *B. gracilis*, *B. recurvata* (generaron 3.9 a 9.4 brotes por explante), estas mismas concentraciones para *Dasyllirion leiophyllum* y *D. lucidum* (10.3 y 6.8 brotes por explante). En cambio 3 mg L⁻¹ en *D. longissimum* y *N. parviflora* fue el mejor tratamiento con 2ip (6-γ,γ-dimetilalilaminopurina) generó mayor número de brotes (9.2 y 9.6 brotes por explante). Por otra parte 3 mg L⁻¹ metatopolina (MT) en *D. serratifolium* y *Nolina longifolia* fue el mejor tratamiento (7.2 y 9.8 brotes por explante), (Reyes Silva *et al.*, 2013).

Plántulas con 6 cm longitud se les recortaron raíces y hojas, se dividieron en dos secciones para *B. purpusii*, una sección longitudinal fue el explante empleado, el mejor tratamiento suplementado con BA, indujo 6.74 brotes por explante a una concentración de 13.3 μM (3 mg L⁻¹), (Vadillo-Pro *et al.*, 2016).

3.6.2. Organogénesis indirecta

En *Agave hybrid* No. 11648, se han empleado segmentos (3 a 8 mm) de punta de brote columnar y extremo de hoja basal inmadura (5-8 mm) en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BA + 0.2 mg L⁻¹ ANA. Dichos tratamientos generaron el callo idóneo, de consistencia compacta de color amarillo verdoso claro y de aspecto nodular. Este callo fue cultivado en medio Hildebrandt suplementado con 5 mg L⁻¹ BA + 0.1 mg L⁻¹ ANA y 0.1 mg L⁻¹ AIB que generaron un porcentaje de inducción de brotes del 98% (Zhang *et al.*, 2013).

Para la organogénesis indirecta en *Beaucarnea inermis* se usó el medio MS, en segmento basal de hoja que generó 2.8 brotes adventicios en 6 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ ANA. El explante de callo y ápice de tallo formaron 11.3 y 15.7 brotes ambos en presencia de 2 mg L⁻¹ de 6-benciladenina (Guillen *et al.*, 2015).

3.6.3. Embriogénesis somática directa

Método de regeneración donde se puede usar como propágulo al embrión, plántula u hoja. Los embriones somáticos se forman directamente de células en el explante original (Harmann *et al.*, 2014).

3.6.4. Embriogénesis somática indirecta

Para la embriogénesis somática en *Beuacarnea inermis* se utilizó el medio B5 con segmento basal de hoja y callo derivado del ápice de brote los que generaron una media de 2.2. y 3.6 embriones, ambos en presencia 0.5 mg L⁻¹ cinetina + 2 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético. En el ápice de tallo se generan 6.8 embriones en promedio con 0.5 mg L⁻¹ de Cinetina + 4 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (Guillen *et al.* 2015).

3.7. Protocolo de desinfestación semillas

El establecimiento de semillas *in vitro* es una de las fases más complicadas debido a que en las semillas nativas se generan los protocolos de desinfestación para cada especie que se estudia en su momento, de la conservación y almacenamiento de semillas también existen poca información acerca de ellas. Los protocolos que ya se han

generado para semillas establecidas *ex vitro* e *in vitro* serán útiles si la sanidad de la semilla es comparable a la que se utilizó en las investigaciones, de lo contrario se tendrán que usar ingredientes activos más concentrados y por más tiempo.

Semillas recolectadas de una población natural de *B. purpussi* se almacenaron a 4 °C hasta que se usaron para establecerse *in vitro* (Vadillo-Pro *et al.*, 2016). El almacenamiento en condiciones ambientales por un año en el género *B. recurvata* no tuvo efectos negativos en el porcentaje de emergencia y el índice de velocidad de emergencia *ex vitro* (Rosa *et al.*, 2014). Así también *B. gracilis* mantuvo un 89.3 % de emergencia en semilla fresca o de un año almacenada (Rodríguez *et al.*, 2019)

Se ha indicado en *Nolina parviflora*, la presencia de organismos patógenos en sus semillas, los cuales disminuyen el desarrollo de plántulas durante la producción en vivero ya que, incrementa la tasa de mortalidad en el proceso de germinación que llegan hasta 39%, este riesgo puede ser erradicado mediante la desinfestación de semilla. Flores *et al.* (2019) encontraron que al comparar los tratamientos de desinfestación de semillas de *Nolina parviflora* con NaOCl (3% v/v) 5 min y 1 min C₂H₆OH; 10 min C₂H₆OH y 24 horas con H₂O₂ en agitador mecánico Orbit TM, las semillas tratadas con peróxido de hidrógeno fueron significativamente mejores al resto de los tratamientos.

La desinfestación en la mayoría de los protocolos para el establecimiento de semillas *in vitro* consiste primeramente en el lavado de las semillas, con agua corriente durante 30 minutos en *B. inermis* (Guillen *et al.*, 2015), por 15 min en *B. recurvata* (Waly *et al.*, 2018), con agua jabonosa durante 10 min para *C. hookeri* (Nuñez *et al.*, 2021), tres lavados con detergente líquido y Dermoclean al 1% en semillas de géneros *Beaucarnea*, *Nolina* y *Dasyllirion* (Reyes-Silva, *et al.*, 2013), un lavado con Dawn detergente durante 30 min para *B. gracilis* y *B. recurvata* (Osorio –Rosales y Mata-Rosas, 2005), lavados sucesivos con detergente líquido 30 min en *B. purpussi*. En el caso de *B. purpussi* las semillas fueron tratadas con 0.3 % captán 50 por 24 h en (Vadillo- Pro *et al.*, 2016), remojo de agua destilada esterilizada (ADE) después del lavado (Waly *et al.*, 2018) El inicio del proceso de esterilización lo hicieron con alcohol etílico al 70 % por un min (Guillén *et al.*, 2015), peróxido de hidrogeno por 5 min y 10 min (Núñez *et al.*, 2021; Vadillo-Pro *et al.*,

2016). El segundo compuesto en el proceso de esterilización que han usado es hipoclorito de sodio al 6% de i.a. en diferentes concentraciones, en solución al 10% por 20 min (Silva-Reyes *et al.*, 2013); solución al 30% durante 30 min; solución al 20% v/v (Waly *et al.*, 2018), solución al 30% (Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005), + dos gotas de tween 80/100 mL durante 10 y 30 min respectivamente en agitador magnético; concentrado (6 % de i. a.) + dos gotas de tween 80/100 mL durante 5 min (Núñez *et al.*, 2021); Vadillo-Pro (2016) en este segundo paso uso etanol 70% por 1 min y a continuación solución al 30% hipoclorito al 6% + tween 80® al 1% por 30 min. Finalmente, para eliminar las trazas de soluciones utilizadas durante la desinfección, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada bajo condiciones asépticas (Guillen *et al.*, 2015; Núñez *et al.*, 2021; Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005; Vadillo-Pro *et al.*, 2016); cuatro enjuagues 4 veces bajo mismas condiciones, adicionalmente se incubaron 30 min en 50 mL de PPM (Plant Preservative Mixture), o no se enjuagaron (Reyes Silva *et al.*, 2013). Adicionalmente las semillas se impregnaron de benomyl (Núñez *et al.*, 2021).

3.8. Germinación *in vitro* semillas

Guillen *et al.* (2015) mencionan que después de 30 días de haber sembrado las semillas *in vitro* de *B. inermis*, se registró 92% de germinación, y las plántulas a los 90 días se caracterizaron por la presencia de raíces y con 4 a 6 hojas.

En el trabajo de Osorio-Rosales y Martín Rosas (2005) con dos especies *B. gracilis* y *B. recurvata*, mencionan que durante la germinación *in vitro* para ambas especies inició al quinto día después de ser colocadas en el medio de cultivo y alcanzó el 89.8 % (*B. gracilis*) y 95.3 % (*B. recurvata*) después de 30 días de cultivo (Osorio-Rosales y Martín-Rosas, 2005).

Los medios usados en el género *Beaucarnea* para la germinación *in vitro* a fin de obtener plántulas para explante y sus características se muestran en el (cuadro 3.1.).

Cuadro 3. 1. Medio de cultivo

sp	CT	mL M	MS suplementado	pH	agar	Autoclaveado	Referencia
<i>B. gracilis</i> y <i>B. recurvata</i>	F 125 mL	25 mL	2 mg L ⁻¹ de GC, 100 mg L ⁻¹ de MI, y 30 g L ⁻¹ de SC	5.7 antes agregar AG	5.5 g L ⁻¹	120 °C por 15 min	(Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005)
<i>B. inermis</i>	F 125 mL	30 mL	100 mg L ⁻¹ MI, 4 mg L ⁻¹ de T-HCl, 30 g L ⁻¹ de SC	5.7 antes del AG	8 g L ⁻¹	1.7 kg cm ⁻² , 120 °C por 15 min	Guillén <i>et al.</i> , 2015)
<i>Beaucarnea recurvata</i> Rose., <i>B. gracilis</i> y <i>B. recurvata</i>				5.7	8 g L ⁻¹		Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013)

AG: agar, CT:contenedor, F: frascos, GC: glicina, M: medio de cultivo, MI: mio-inositol, MS: Murashigue & Skoog, SC: sacarosa, T-HCl: tiamina HCl.

Durante el proceso de germinación las condiciones de incubación son las siguientes (cuadro 3.2.).

Cuadro. 3. 2. Condiciones de incubación siembra de semillas *in vitro*

S/ F	R	IC	FP	% G	Referencia
5	60	25 ± 1°C	16 h (50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Por SM	(Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005)
6	24	27 °C	16 h L, I de 45 se $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 8 h O	estandarizó a los 30 d	Guillén <i>et al.</i> , 2015)
150 S por sp		25 ± 2 °C	Bajo LC ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	(54 por 30 a 60 d)	Silva <i>et al.</i> , 2013)

G: germinación, F: frasco, FP: fotoperiodo, I: intensidad, IC: incubación, LC: luz continua, SM: semanal, sp: especie, O: oscuridad.

3.9. Multiplicación *in vitro*

3.9.1. Hiperhidratación

La hiperhidratación en brotes generados *in vitro* es un desorden fisiológico que origina plantas frágiles con apariencia vidriosa, y se interpreta como un aumento en el contenido de agua en las plantas (Ziv, 1991).

En el cultivo de brotes, Ziv *et al.* (1987) indicaron que en medios de proliferación líquido o semisólido a menudo se desarrollan plantas vítreas con hojas traslúcidas y suculentas. Este tipo de hojas carecen de ceras y desarrollo de estomas con células guardas no funcionales (Ziv *et al.*, 1987; Majada *et al.*, 1998). Ziv *et al.* (1987) determinaron que la causa de la falla del cierre de estomas en hojas vítreas se encuentra relacionado a la pared de las células guarda y no al protoplasto.

En el cultivo de ápices en un medio con minerales a menor concentración, pero con elevada concentración de Ca^{++} Ziv *et al.* (1987) obtuvieron plantas con hojas normales y células guarda funcionales.

La reducción de humedad en los tubos de cultivo (Ziv *et al.* 1987), vasos de cultivo con ventilación, 0.86 cambios h^{-1} (Majada *et al.*, 1998) y concentración alta de agar en el medio, indujo el desarrollo de hojas normales y estomas con incrementos en la supervivencia de plantas de clavel trasplantadas (Ziv *et al.*, 1987).

La vidriosidad de sauce (*Salix babylonica*) pudo ser controlada por la cantidad de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo, Daguin y Letouzé, (1986) registraron actividad de glutamato deshidrogenasa en diferentes partes de la planta durante inducción del proceso de vitrificación. Dependiendo del medio Knop o MS, la mayor diferencia en el nivel de actividad de glutamato deshidrogenasa fue registrado en plantas de 42 días de edad. El contenido en el medio de 6.25 mM NH_4^+ y 11.73 mM de NO_3^- registraron 2.53 nanokatal (nkat) $(\text{g FW})^{-1}$ de actividad en raíz, medio Knop y en medio MS 6.25 mM NH_4^+ y 25.04 mM de NO_3^- fue de 9.91 nkat $(\text{g FW})^{-1}$ de actividad en raíz, a estas concentraciones las plantas se mostraron los niveles más bajos de aspecto vítreo, incrementado a medida que se incrementan las concentraciones. Aunque ha sido mostrado que el etileno, potencial de matriz y el alto contenido de citoquininas están implicados en vitrificación (hiperhidratación), cuando el contenido de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo es tomado en cantidad, se puede predecir el riesgo de que el material vegetal se vuelva vidrioso.

Plantas crecidas *in vitro* en recipientes de cultivo no ventilados tuvieron menos ceras y por lo tanto alta pérdida de agua relativa comparado a plantas crecidas a tasas de ventilación de 0.86 cambios h^{-1} (Majada *et al.*, 1998). La mejora de la función estomática en hojas obtenida en recipientes de cultivo ventilados puede ser debido a la mejora de relaciones iónicas entre células guarda y las subsidiarias, principalmente por un incremento en la concentración de K^+ en la célula guarda cuando disminuye la ventilación.

En la fase de multiplicación de brotes de *Geophila macropoda*, Vargas-Castillo y Abdelnour-Esquivel (2010), reportaron hiperhidratación en porcentajes menores del 20 % en los medios que fueron suplementados de 0 a 2 mg L⁻¹ de BAP, sin embargo, en aquellos explantes cultivados en presencia de 3 y 4 mg L⁻¹ de BAP, los porcentajes fueron mayores variando de 28.66% a 41 % de hiperhidratación para cada concentración de BAP respectivamente.

En *Beaucarnea purpussi*, Vadillo-Pro *et al.* (2016) reportaron brotes hiperhidratados, éstos no fueron viables y finalmente causaron la pérdida de explantes por oxidación. Así mismo, la exposición de explantes a citocininas (TDZ, BA y KIN) en concentraciones más altas, generaron mayor número de brotes hiperhidratados.

También en *Asparagus officinalis*, Millán-Soto *et al.* (2019), reportaron hiperhidratación debido a la presencia de auxinas y citocininas en el medio en 46% de los tratamientos que generaron rizomas con apariencia acuosa y turiones deformes. Las concentraciones mayores de fitoreguladores aumentaron la hiperhidratación en el tejido de brotes en desarrollo. La presencia hiperhidratación estuvo asociada al engrosamiento del turión. Finalmente, la reducción de hiperhidratación (en 10.4 % de los tratamientos) se obtuvo con la resiembra de rizomas en medio de cultivo y sin reguladores de crecimiento.

En otra investigación Núñez *et al.* (2021) observaron que alrededor de 180 brotes de *C. hookeri*, originados de semillas germinadas *in vitro* que dejaron de crecer y no continuaron su desarrollo, algunas se deformaron, posiblemente por hiperhidratación, sin producción de brotes, por lo que el número de repeticiones se redujo de 30 a 15 plántulas por tratamiento y posteriormente fueron subcultivados a los 28 días de germinadas en un medio con diferentes citocininas 2.5, 5 y 7 mg L⁻¹ (TDZ, BA y KIN); estas concentraciones fueron las mismas que se usaron durante el establecimiento. El tratamiento con 7 mg L⁻¹ de TDZ, generó brotes que no desarrollaron hojas y cuando formaron se deformaron, por lo que este tratamiento se excluyó.

3.9.2. Tipo de explante

Hay un efecto dependiendo del tipo de explante. Osorio-Robles and Mata-Rosas (2005), reportaron que las secciones longitudinales de plántulas germinadas *in vitro* sin

reguladores en *Beaucarnea recurvata* y *B. gracilis* tuvieron mayor capacidad de formar brotes, comparada con las mismas plántulas (con raíces y puntas de hojas recortadas), cuando se sometieron a un medio MS suplementado con 5 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina.

Otro tipo de explante utilizado son las porciones basales de 10 a 15 mm de longitud, donde se eliminan las hojas y raíces de plántulas germinadas *in vitro*, Reyes-Silva *et al.* (2013) utilizaron éste tipo de explante en la etapa de multiplicación de 10 especies de géneros *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina*, se inocularon en posición vertical en medio basal suplementado con citocininas y se mantuvo con la polaridad de plántulas germinadas.

Para generar organogénesis directa, Guillén *et al.* (2015), usaron el medio MS y como explantes segmentos basales de hoja con la parte que sujeta a la hoja alrededor del tallo de la planta de 1 cm de longitud. El medio fue suplementado con 2 mg L⁻¹ BAP + 0.5 ANA mg L⁻¹ y 6 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ ANA fueron los que generaron la mayor cantidad de brotes (2.7 y 2.8 brotes por explante).

3.9.3. Bencilaminopurina o benciladenina

El nombre químico de la benciladenina es 6-bencilaminopurina. Considerada una sustancia química sintética, clasificada como un regulador de crecimiento de plantas (RCPs), (Hartmann *et al.*, 2014).

Los estudios realizados empleando benciladenina en especies del género *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina* (*B. goldmanni*, *B. gracilis*, *B. recurvata*, *D. leiophyllum*, *D. lucidum*, *N. duranguensis*) han generado las mejores respuestas en la generación de número de brotes. Pero también fue importante considerar aspectos cualitativos como el grado de diferenciación y la morfología de estos, en el caso de las hojas, éstas mostraron una talla menor (Reyes- Silva, et al., 2013). También se suma el género *B. inermis* a la lista de especies donde la BA puede ser aplicada como una estrategia en sus protocolos de conservación (Guillen *et al.*, 2015).

En el caso específico del género *C. hookeri*, que es la especie de esta investigación, reportó Núñez *et al.* (2021) reportaron que a 5.0 mg L⁻¹ BA es el mejor tratamiento (al generar 26 brotes por semilla), comparado con Cinetina (K), 2-isopentenil-adenina (2ip) y tidiazurón (TDZ).

3.9.4. Ácido naftalen-acético

Es una auxina sintética, bastante estable tanto en mezcla como polvo o líquido. Usualmente se usa en concentraciones de 0.1 a 10 mg L⁻¹, para disolverlo se usa etanol (EtOH) o 1N NaOH y ,su almacenamiento oscila de 0-5 °C (Hartmann *et al.* 2014).

La adición de BA y ANA a bajas concentraciones al medio promovió el desarrollo de brotes adventicios en hoja, callo y ápices de tallo de *B. inermis* (Gillen *et al.*, 2015).

3.9.5. Proporción citocinina/auxina

La interacción de auxinas y citocininas es una de las relaciones primarias en el crecimiento y desarrollo de plantas, así como en la propagación de las mismas. Una proporción alta de auxina: citocinina favorece el enraizamiento, una alta proporción de citocinina: auxina favorece la formación de brotes y un alto nivel de ambas favorece el desarrollo de callo (Hartmann *et al.*, 2014).

Bencilaminopurina + ácido naftalen-acético

Guillen *et al.* (2015) promovieron en *B. inermis* la organogénesis utilizando el medio MS y como explantes segmentos basales de hoja, logrando generar 2.7 y 2.8 brotes adventicios en presencia de 2 mg L⁻¹ BA+ 0.5 mg L⁻¹ ANA y 6 mg L⁻¹ de BA + 0.5 mg L⁻¹ ANA respectivamente. La adición de BA y ANA a bajas concentraciones promovió el desarrollo de brotes adventicios en hoja, callo y ápices de tallo de *B. inermis* (Guillen *et al.*, 2015).

3.10. Condiciones de incubación

Temperatura. El proceso de organogénesis directa en *B. gracilis* y *B. recurvata* se llevó a cabo en temperaturas de 25 ± 1 °C (Osorio-Rosales y Martín-Rosas, 2005).

Fotoperiodo. Las especies *B. gracilis* y *B. recurvata* fueron propagadas *in vitro* por medio de organogénesis directa y se incubaron en fotoperiodo de 16 h luz ($50\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Osorio-Rosales y Martín-Rosas, 2005).

3.11. Etapa de enraizamiento

3.11.1. Ácido Indolbutírico

Es una auxina sintética, de uso general por no ser tóxica para las plantas de amplio rango de concentración (usualmente 0.1 a 10 mg L⁻¹). Para su preparación se disuelve en etanol (EtOH) o 1N hidróxido de sodio (NaOH), es posible la esterilización en autoclave y además, es un compuesto relativamente estable y la vida útil se puede extender por la oscuridad y la refrigeración a -0 °C (Hartmann *et al.* 2014).

El uso de esta auxina favorece la formación de raíces adventicias en brotes individualizados de *B. inermis*, Guillen *et al.* (2015) aumentaron el enraizamiento de la especie al usar el medio MS con 1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-bútirico; sin embargo, en el tratamiento sin hormona también se observó la formación de raíces, aunque en menor proporción (Guillen *et al.*, 2015).

El medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) fue empleado para el enraizamiento de *C. hookeri* (Núñez *et al.*, 2021); en el género *N. parviflora* (Flores García *et al.*, 2009) y en los géneros *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina* (Reyes-Silva *et al.*, 2013).

El enraizamiento *in vitro* de brotes adventicios en *Beaucarnea inermis*, tuvo una duración de cuatro semanas (Guillen *et al.*, 2015), en *Calibanus hookeri* duró 45 días (Núñez *et al.*, 2021), en los géneros *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina* 45 a 50 días (Reyes-Silva *et al.*, 2013).

En *B. inermis* la mayor cantidad de raíces se presentó a 0.5 y 1 mg L⁻¹ de AIB (Guillen *et al.*, 2015), en el género *N. parviflora* concentraciones 1 mg L⁻¹ de AIB, la combinación 0.1/1 y 0.1/0.1 mg L⁻¹ de AIB/KIN tuvieron efecto de la longitud de raíz (5.8, 9.2 y 7.4 cm de longitud), (Flores-García *et al.*, 2009). Es recomendable usar las concentraciones más

bajas donde se registre el inicio del enraizamiento para evitar desarrollo fisiológico anormal de raíces (Martínez- palacios *et al.*, 2003).

El tratamiento sin fitohormonas en medio MS permitió la formación de raíces en *B. inermis*, aunque en menor proporción (Guillen *et al.*, 2015), en *C. hookeri* se logró 100% de enraizamiento (Núñez *et al.*, 2021), en el género *Beaucarnea* el medio MS con 2 g L⁻¹ de carbón activado alcanzó valores de 63 y 75% de enraizamiento mientras que en los géneros *Dasyllirion* y *Nolina* fue de 83 y 100 % y no se observó diferencia entre el medio sin carbón activado y el que lo contenía (Reyes-Silva *et al.*, 2013).

La supervivencia de plantas *B. inermis* fue mayor del 96% y no se observaron diferencias significativas entre las enraizadas en medio base y con AIB (Guillen *et al.*, 2015). Las plantas alcanzaron el estado juvenil después de 180 días de cultivo bajo condiciones de invernadero, y el 100% registró el ensanchamiento de la base del tallo o en forma de “cebolla” típica de estas plantas.

3.12. Aclimatización

El balance de agua durante la aclimatización es regulado por la cutícula y la transpiración estomática. Plantas de clavel cultivadas *in vitro* en vasos ventilados (0.86 cambios h⁻¹) desarrollaron una morfología y anatomía que disminuyó la pérdida de agua en el trasplante, posiblemente como consecuencia de la deposición alta de cera epicuticular en ambos, superficie de hoja y/o mejor funcionamiento estomático (Majada *et al.*, 1998).

El estado de proliferación precedido en recipientes de cultivo ventilados, las características fisiológicas de las plantas producidas son mejor que las obtenidas en recipientes de cultivo no ventilados, esto fue confirmado por la más alta supervivencia después del trasplante a suelo (Majada *et al.*, 1998).

La aclimatización es la etapa en la que se define la supervivencia de las plantas que se han multiplicado y/o enraizado *in vitro*. Para esta etapa Reyes-Silva *et al.* (2013), usaron una mezcla de suelo comercial y arena 1:1. Se cubrieron con una bolsa de plástico transparente para retener la humedad. Después de una semana hicieron orificios a la cubierta plástica y a la tercera semana la misma se eliminó por completo. La

supervivencia de las plantas generadas *in vitro* la determinaron a la sexta semana. Se concluyó que la adaptación al suelo fue exitosa cuando la planta dio señales de reiniciar su crecimiento ya en condiciones *ex vitro*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

Las semillas de *Calibanus hookeri* utilizadas en la investigación fueron donadas por el Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. La investigación se desarrolló en el laboratorio de Embriogénesis Somática del postgrado de Fruticultura ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en las coordenadas son 19°27'30" L N y 98°54'14" L O, con una altitud de 2240 msnm.

Este estudio se realizó en tres etapas: la primera fue el establecimiento mediante la germinación en medio cultivo suplementado con reguladores de crecimiento para generar una organogénesis directa a partir de plántulas germinadas de *C. hookeri*, la segunda etapa fue el subcultivo de los brotes generados, y la tercera fue el enraizamiento y aclimatación de brotes subcultivados.

4.2. Material vegetal

El desglose del material vegetal empleado se describe en los cuadros: 4.1, 4.2 y 4.3. Las semillas establecidas en BAP tenían 14 meses y las establecidas en BAP-ANA 15 meses de almacenamiento, conservadas en un sobre papel manila a temperatura ambiente del Colegio de Postgraduados, en un lugar seco, sin ningún tratamiento.

4.3. Tratamientos

4.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo fue preparado de acuerdo a las concentraciones de sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) con reactivos de las empresas Merck, Sigma Aldrich, Meyer, Reasol y Baker. Se realizaron las preparaciones de soluciones madre 100 x para facilitar la preparación del medio de cultivo y éstas se conservaron en refrigerador-congelador modelo GM-324QCA. Se usaron pipetas de 1, 5, 10 mL, probetas de 25 y 100 mL, marca Pirex y Kimax, para extraer de los frascos Erlenmeyer donde se prepararon las soluciones madre. Una vez que se añadieron las sales MS (1962), se complementó con myo-inositol (100 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), piridoxina HCl

(0.5 mg L⁻¹), tiamina HCl (0.1 mg L⁻¹) y glicina (2 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), se agregaron los reguladores de crecimiento de acuerdo a los tratamientos en establecimiento BAP (cuadro 4.4) y el segundo establecimiento BAP-ANA (cuadro 4.6), se aforó al volumen deseado de medio de cultivo, se ajustó el pH a 5.7 utilizando NaOH 1N para subir y HCl 1N para bajar el pH.

Cuadro. 4. 1. Material vegetal utilizado en la investigación de *C. hookeri*, propagación *in vitro*, Laboratorio de Embriogénesis, Colegio Postgraduados

Fases	Tipo Propágulo	Origen Propágulo	Fecha Establecimiento	BAP mgL ⁻¹
E	S	Planta de jardín botánico FES UNAM Iztacala	29/12/2020	0, 2.5 y 5.0
SC1	B	B de la fase E BAP	21/03/2021	2.5 y 5.0
SC2	B	B de PM subcultivadas 0.5 y 1.0 BAP	08/06/2021	0,0.5 y 1.0
SC3	B	B del SC2, sólo 0.5 BAP	13/07/2021	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5
SC4	B	B sanos del SC3	24/08/2021	0, 0.5
SC4-1	B	B de SC3 con HH inicial	26/08/2021	0, 0.5 y 1.0
SC5-1	B	B de SC4 de BM SC3 0.5 y 1.0 BAP	13/10/2021	0,0.5 y 1.0
SC5	B	B de SC4	16/10/2021	0, 0.5

RCP: regulador de crecimiento de plantas; E: establecimiento; S: semilla; SC: subcultivo; B: brotes; BM: brote madre; PM: planta madre; BAP: bencilaminopurina; HH: hiperhidratación.

Cuadro. 4. 2. Material vegetal utilizado en investigación de *C. hookeri*, propagación *in vitro* con BAP + ANA.

Fases	Tipo Propágulo	Origen Propágulo	Fecha Establecimiento	RCP	
				BAP mgL ⁻¹	ANA mgL ⁻¹
E	S	Planta del jardín botánico UNAM Iztacala	FES 21/01/2021	0, 2.5, 5.0	0, 0.5 y 1.0
SC1	B	B de E ANA	BAP + 24/04/2021	0, 2.5, 5.0	0, 0.5 y 1.0
SC2	B	B de PM subcultivada 0.5, 1.0 ANA	al a y 24/06/2021	0, 0.5 y 1.0	0, 0.1 y 0.5

RCP: regulador de crecimiento de plantas; E: establecimiento; S: semilla; SC: subcultivo; B: brotes; BM: brote madre; PM: planta madre; BAP: bencilaminopurina; ANA: ácido naftalenacético.

Cuadro.4.3. Material vegetal utilizado en la investigación de enraizamiento y aclimatización, Laboratorio de Embriogénesis, Colegio Postgraduados

Fases	Tipo Propágulo	Origen Propágulo	Fecha Establecimiento	RCP	
				AIB mg L ⁻¹	Radix 10000® (AIB) mg Kg ⁻¹
EyAT	BM	BM de SC2 (0.5 y 1.0) BAP	07/08/2021	NA	0, 1000, 2000 y 4000
ER	BM	BM de SC4 (0.5 y 1.0) BAP	10/09/2021	0, 0.1, 0.25 y 0.5	NA
IEAT	BM	BM de SC4 (0.5) BAP	19/10/2021	0, 0.5 y 1.0	NA

BM: brotes madre; AIB: ácido indol-3-butírico; EyAT: enraizamiento y aclimatación en tubete.; ER: enraizamiento; IEAT: inducción de enraizamiento y aclimatación en tubete, NA: no aplica.

Se adicionaron 8 g L⁻¹ de agar al medio, se disolvió en horno de microondas mca. Winia, durante aproximadamente 10 min L⁻¹, una vez que el agar estaba completamente disuelto, se vertieron 20 mL en los tubos de ensayo (150mm x 22 mm, con tapones de plástico transparentes). En el caso de los subcultivos con bajas concentraciones de BAP,

se colocaron 15 mL por tubo de ensayo a excepción del enraizamiento con AIB (0, 0.1, 0.25, 0.5 mg L⁻¹) que se agregaron sólo 10 mL.

La esterilización del medio de cultivo se realizó en autoclave (eléctrica de Trew ,1982) a 1.7 kg cm⁻² durante 15 min, para los establecimientos con BAP, BAP-ANA, para los subcultivos a bajas concentraciones de BAP y BAP-ANA la esterilización se realizó a 1.5 kg cm⁻². Los tubos de ensayo se almacenaron en vitrina previamente desinfectada con alcohol al 96%, para posteriormente utilizarse al momento del establecimiento.

4.3.2. Establecimiento

4.3.2.1. Protocolo de desinfección

El protocolo de desinfección de las semillas, para el establecimiento en BAP, consistió en la extracción del sobre manila y la selección después de eliminar la testa (en base al color de la semilla) la que consistió en la eliminación de las semillas que presentaran color verdoso, grisáceo para evitar la presencia a simple vista de micelio de hongo o daño mecánico. Una vez que se tenían 150 semillas, se colocaron en un vaso de precipitado (250 mL de volumen), se agregaron 10 g L⁻¹ de detergente biodegradable Roma ® y 250 mL de agua del grifo; se les colocó una gasa de algodón sobre el vaso y se fijó con una liga (figura 4.1.A), se situó durante 30 min a la caída del agua a una velocidad baja, pero homogénea del grifo, completados los 30 min, se eliminó el agua jabonosa sin mover la gasa, este procedimiento se repitió por dos ocasiones. Finalmente se agregó agua del grifo a muy baja velocidad, pero sin la gasa. Terminado el enjuague, se añadió alcohol al 70% por 1 min, se enjuagó con agua del grifo, (tres veces consecutivas), y también se usó solución de hipoclorito de sodio al 30% v/v en un vaso de precipitado de 100 mL (figura 4.1. B), se agregaron dos gotas de tween 20 ® durante 30 minutos, durante éste lapso de tiempo se agitó de forma manual con una espátula, 5 veces un intervalo de 30 s cada vez, antes de completar los 30 min, se llevó a la campana de flujo laminar previamente sanitizada (con detergente roma®, cloro 30% v/v y alcohol 96%), se eliminó la solución de cloro en un vaso de precipitado de 600 mL y se enjuagaron cinco veces con agua desionizada, esterilizada en forma consecutiva. Se utilizaron 100 mL de una solución de ácido sulfúrico 4N que se agregó a las semillas

previamente enjuagadas, por un lapso de 5 min, en agitación manual con una espátula, 3 veces durante 10 s, terminado el tiempo se enjuagaron 5 veces de forma consecutiva con agua desionizada, esterilizada, se escurrió el agua del vaso de precipitado y las semillas estaban listas para sembrarse en los tubos de ensayo.

El protocolo para el establecimiento de las semillas en la combinación de RCP BAP + ANA, fue el mismo procedimiento al de BAP aunque pudo provocar daño el hecho de que se preparara la solución 4N del ácido sulfúrico en presencia de las semillas, provocó una coloración rosa.

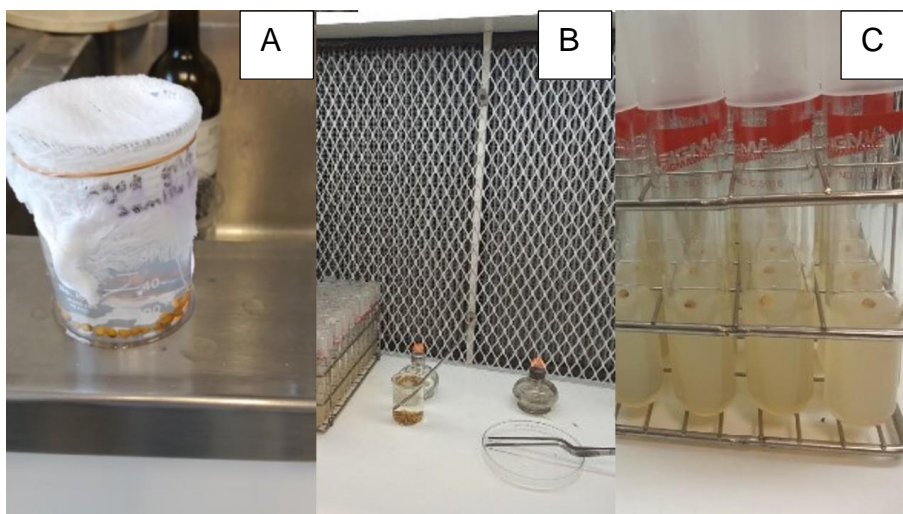


Figura 4. 1. Proceso de desinfección y siembra de semillas *C. hookeri*. A. lavado de semillas con solución detergente; B. semillas en solución con cloro y C. semillas sembradas.

4.3.2.1. Siembra

Las semillas se sembraron en tubos de ensayo con 20 mL de medio base (figura 4.1. C) Murashige y Skoog (MS 1962) complementado con 2 mg L⁻¹ de glicina, 100 mg L⁻¹ de myo inositol, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0.5 mg L de ácido nicotínico, 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina HCl, más 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1N o HCl 0.1N. Se esterilizó en autoclave a 1.7 Kg cm⁻² durante 15 min. Se sembró una semilla por tubo de ensayo de 150 x 22 mm en campana de flujo laminar previamente desinfectada y se establecieron para su germinación 120 semillas.

Los tubos de ensayo se colocaron en sala de incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un flujo total de fotones de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provisto por lámparas fluorescentes de luz blanca-fría y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Las semillas se monitorearon a los 5 días y al completar 10 días, para registrar plantas contaminadas y el porcentaje de germinación. Se consideró como semilla germinada cuando la radícula presentó 1 mm de longitud.

4.3.3. Subcultivo

El subcultivo se realizó de los brotes generados de concentraciones altas en BAP a los 40 días de haberse iniciado la generación de brotes, y en el caso de BAP-ANA a los 50 días, cabe señalar que cada semilla establecida germinó, se desarrolló y generó los brotes en el mismo medio, hasta que se realizó la primera separación de los brotes de la planta madre considerando el subcultivo uno (SC1). (Figura 4.2).

En el caso de los subcultivos a bajas concentraciones, el intervalo de tiempo en separar los brotes del principal (brote madre) fue de 30 a 40 días después de subcultivados.

La separación de los brotes de la planta madre (plántula generada de semilla) o brote madre (brote que se estableció para producir brotes) (figura 4.2) se realizó en la campana de flujo laminar, con ayuda de pinzas, bisturí y cajas Petri previamente esterilizadas en autoclave, todo lo que se introdujo a la campana fue asperjado con alcohol 96% v/v. Los brotes que se separaron fueron colocados en tubos de ensayo 22 mm x 15 cm, con medio de cultivo y reguladores de crecimiento de acuerdo a los tratamientos diseñados (cuadro 4.4.) en cada subcultivo. En el caso del quinto subcultivo se realizó en frasco con volumen de 100 mL.

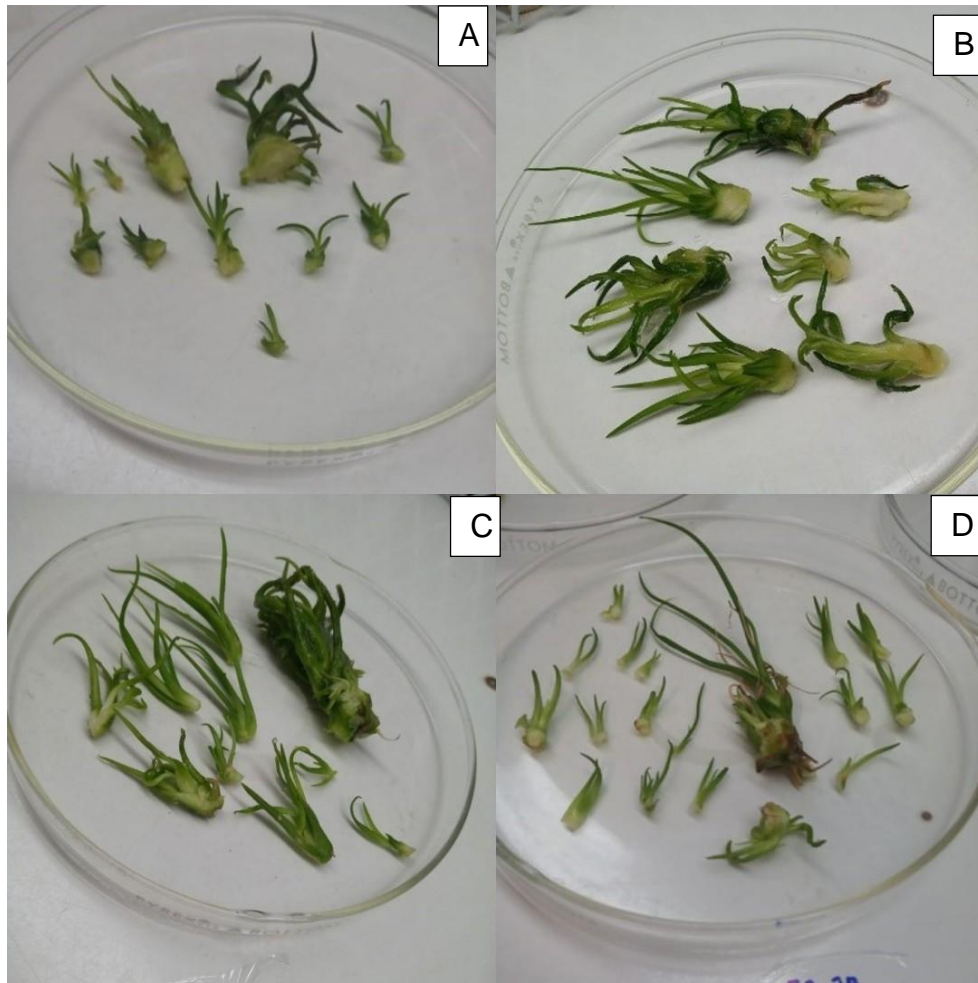


Figura 4. 2. Brotes separados del brote propágulo para su subcultivo. A. brotes generados en SC1 con 5, 0.1 mg L⁻¹ BAP + ANA; B. 2.5, 0.5 mg L⁻¹ BAP + ANA a los 90 de establecidos; C. Material vegetal 2.5, 0.1 BAP + ANA para SC1. D. Brotes empleados en SC2 BAP.

4.3.4. Enraizamiento

El enraizamiento se realizó en el medio MS al 100% y el regulador empleado fue el AIB de acuerdo con los tratamientos (cuadro 4.6). En campana de flujo laminar, se extrajeron los brotes madre de los tubos de ensayo y se colocaron en cajas Petri para la separación de brotes generados. A los brotes madre se les eliminaron las hojas secas o maltratadas, así mismo se eliminó en la base del tallo, el daño ocasionado por la exposición al medio. Los brotes fueron colocados en los tubos de ensayo de 22 mm de diámetro y 150 mm de largo que contenía los tratamientos de enraizamiento (cuadro 4.6.) y los brotes

generados también se colocaron de acuerdo con el tratamiento diseñado en subcultivo (cuadro 4.4.).

4.3.5. Aclimatización

4.3.5.1. Aclimatización y enraizamiento en tubete

Se aclimataron sesenta brotes generados en el segundo subcultivo de 0.5 BAP de la planta madre expuesta a bajas concentraciones de BAP, los que se colocaron en cuatro tratamientos: 0, 1000, 2000 y 4000 mg Kg⁻¹. La preparación de la mezcla fue realizada con Radix 10 000 y talco para bebe. Se pesó en una báscula 0.1, 0.2, 0.4 g de enraizador y a esta cantidad se le agregó talco hasta completar en la báscula 1 g, esta mezcla se colocó en frascos con tapa y se agitaron horizontalmente para lograr que se mezclaran ambas sustancias.

Los tubetes de 140 mL de volumen y sus bases, se esterilizaron como a continuación se indica: los tubetes y bases se lavaron con estropajo en la parte externa y en la parte interna de los tubetes se realizó con escobillón, se empleó una solución de detergente biodegradable Roma®, se enjuagaron con agua del grifo y se escurrieron en las bases, posteriormente se colocaron en una solución de NaOCl al 30 % v/v durante 20 min, una vez alcanzado el tiempo se enjuagaron con agua del grifo listos para utilizarse.

La mezcla de sustrato que se empleó fue a base de peat moss Promix ® y perlita (1:1), para su esterilización se mezclaron 5 L de peat moss y 5 L de perlita en una cubeta de plástico limpia, se agregó 1 L de agua para humedecer el sustrato, se procedió a mezclar ambos sustratos para homogeneizar la mezcla, posteriormente se colocaron 2.5 L en una bolsa de polipapel 35 x 45 Reyma® para su esterilización.

La esterilización del sustrato se realizó en una autoclave eléctrica de Trew, 1982, donde se colocaron tres canastillas, cada una se le colocó una bolsa con 2.5 L aproximadamente de sustrato, se esterilizó a una presión de 1.7 kg.cm², 30 min, (dos veces), dejando pasar un día entre la primera y segunda esterilización, finalmente se almacenaron las bolsas con el sustrato en un anaquel.

Los brotes que se sometieron a enraizamiento y aclimatación se extrajeron de tubos de ensayo, se eliminó callo en el caso de que se presentará, también hojas con coloración verde clara, se asperjó la base del tallo con una solución de Timsem® 1 g L⁻¹. Se eliminó el agar de la base del tallo con agua destilada, desionizada (desionizador Reverse Osmosystem), esterilizada a una presión de 1.7 kg.cm² durante 15 min, se eliminó el exceso de agua sacudiendo la planta y poniéndola en contacto ligeramente en una sanita®, Una vez eliminado el exceso de agua, la base del tallo se impregno con la mezcla de 1000, 2000, y 4000 mg Kg⁻¹ de radix® según el tratamiento (cuadro 4.6.) que le correspondió, para colocarse en tubete previamente llenado con el sustrato, se realizó un orificio de 2 cm aprox. con la ayuda de un espátula de 0.5 cm de ancho y se colocó la planta. Finalmente, se le agregaron 20 mL de agua desionizada destilada, encima de cada brote, hasta caer a la mezcla de sustrato. A cada tubete se le colocó una liga y posteriormente se colocó una bolsa 8 x 26, para cubrir el brote, sujetándola con la liga para iniciar el proceso de enraizamiento y aclimatación. Una vez concluido el establecimiento se colocaron los tubetes en la base y se llevaron al cuarto de incubación donde se les colocó en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad con lámparas de luz blanca-fría con una intensidad de 80 μmol.m⁻².s⁻¹. Las bolsas se eliminaron a los 40 días. La evaluación de supervivencia con raíz se realizó a los 80 días del trasplante.

4.3.5.2. Inducción de enraizamiento AIB y aclimatación en tubete

Los brotes madre a enraizar fueron sometidos a una sola concentración, 0.5 mg L⁻¹ de BAP durante 47 días, en este tiempo crecieron y generaron brotes que se les retiraron antes de la inducción al enraizamiento. Los brotes que los generaron fueron sometidos a cinco concentraciones de BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg L⁻¹) estas concentraciones fueron factor para los tratamientos. El medio de inducción de enraizamiento es una modificación del medio de cultivo MS (1962), ya que el NH₄NO₃ y KNO₃ se adicionaron a una concentración del 50%, el medio se suplemento con 30 g L⁻¹ de azúcar refinada Great® value, se adicionaron 0.5 y 1 mg L⁻¹ de AIB, para disolverlo se utilizó 1 mL de NaOH al 1N, estas dos concentraciones son factor de tratamiento, el pH se ajustó a 5.7, se adicionaron 6.5 g L⁻¹ agar, que se disolvió en horno de microondas, se sirvieron 10 mL de medio de cultivo en cada frasco gerber, posteriormente fue esterilizado a 1.5 kg

cm⁻² durante 15 minutos. Para la inducción se colocaron cuatro brotes madre por frasco durante 48 h, cumplido este intervalo de tiempo, se enjuagaron con agua destilada esterilizada para eliminar el agar en la base del tallo. El tratamiento con fungicida antes de plantar los brotes también fue factor de tratamiento, 1 g L⁻¹ Captán 50% i.a. y 1 g L⁻¹ Captán 50% + 10 mL L⁻¹ del coadyuvante Potencior® fungicidas, Velsimex S. A. de C. V. cada brote se colocó en un tubete de 200 cc de reúso, éstos se lavaron con detergente Roma® y desinfectados con NaOCl al 10% v/v durante 1 h, sin enjuagar y se dejarán escurrir hasta secarse.

4.4. Tratamientos

Cuadro. 4. 4. Tratamientos en la propagación *in vitro* de *C. hookeri*, con concentraciones de BAP

Fases	Tratamientos		
	Siglas	Propágulo	BAP mgL ⁻¹
E	TT, T1, T2	S	0, 2.5, 5.0
SC1	T1, T2	BE1	2.5, 5.0
SC2	TT, T1, T2	BPM 0.5 y 1.0, BPM 0.5, BPM 1.0	0, 0.5, 1.0
SC3	TT, T1, T2, T3,T4 y T5	BSC2 0.5 BAP	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5
SC4	TT, T1, T2, T3,T4 y T5	BSC3 sanos (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5)	0, 0.5
SC4.1.	TT, T1 Y T2	B SC3 con HHi	0, 0.5 , 1.0
SC5-1	TT, T1 Y T2	B SC4 de BM SC3 0.5 y 1.0 BAP	0,0.5 , 1.0
SC5	TT, T1, T2, T3,T4 Y T5	B SC4 (BSC3 0.5,1.0, 1.5, 2.0, 2.5)	0, 0.5

E: establecimiento; S: semilla; SC: subcultivo; B: brotes; BM: brote madre, generado de subcultivo; PM: planta madre, la generada de semilla; BAP: bencilaminopurina; HHi: hiperhidratación inicial.

Cuadro. 4. 5. Tratamientos en propagación *in vitro* de *C. hookeri*, en concentraciones BAP + ANA.

Fases	Tratamiento			
	Siglas	Propágulo	BAP mgL ⁻¹	ANA mgL ⁻¹
E	TT,T1, T2, T3, T4	S	0, 2.5 , 5.0	0, 0.1 , 0.5
SC1	T1,T2, T3 , T4	BE1	2.5 , 5.0	0.1 , 0.5
SC3	T1,T2, T3 , T4	SC2	0.5, 1.0	0.02 , 0.1

E: establecimiento; S: semilla; SC: subcultivo; BE: brotes originados de plantas germinadas de semilla.

Cuadro. 4. 6. Tratamientos de brotes madre de *C. hookeri* para el enraizamiento *ex vitro* y enraizamiento *in vitro* con AIB.

Fases	Tipo Propágulo	Origen Propágulo	Fecha Establecimiento	AIB mg L ⁻¹	RCP
					Radix 10000® (AIB) mg Kg ⁻¹
EyAT	BM	BM de SC2 (0.5, 1.0) BAP	07/08/2021	NA	0, 1000, 2000, 4000
ER	BM	BM de SC4 (0.5, 1.0) BAP	10/09/2021	0, 0.1, 0.25, 0.5	NA

BM: brote madre; AIB: ácido indol-3-butírico; EyAT: enraizamiento y aclimatación en tubete; ER: enraizamiento y IEAT: inducción enraizamiento y aclimatación en tubete; NA: no aplica.

La mezcla de sustrato fue a base de peat moss y perlita, 1:1 v/v, previamente esterilizada en autoclave a 1.7 kg cm⁻² durante 30 min, los brotes madre se cubrieron con una bolsa de plástico durante 30 días, al día 15, 20 25 y 30 de establecidas se realizaron 10 orificios con una aguja para remendar en las caras de la bolsa, a los 30 días se retiraron las bolsas y se dio un riego a los brotes con una solución de Steiner a 0.18 atmosferas dos veces por semana. A los 60 días después del trasplante a tubete se realizó la evaluación.

Cuadro. 4 7. Tratamientos de brotes de *C. hookeri* para inducción de enraizamiento *in vitro*

Siglas	Fungicida [†]	AIB mg L ⁻¹	OB [¶] mg L ⁻¹ BAP
T 1	C	0.5	0.5
T2	C	1.0	0.5
T3	C+P	0.5	0.5
T4	C+P	1.0	0.5
T5	C	0.5	1.0
T6	C+P	1.0	1.0
T7	C+P	0.5	1.0
T8	C+P	1.0	1.0
T9	C	0.5	1.5
T10	C	1.0	1.5
T11	C+P	0.5	1.5
T12	C+P	1.0	1.5
T13	C	0.5	2.0
T14	C	1.0	2.0
T15	C+P	0.5	2.0
T16	C+P	1.0	2.0
T17	C	0.5	2.5
T18	C	1.0	2.5
T19	C+P	0.5	2.5
T20	C+P	1.0	2.5
TTP	C+P	0.0	0.5,1.5,1.0 Y 1.5
TTC	C	0.0	0.5,1.5,2.0 Y 2.5

C. captán 50 % i.a., P. coadyuvante potencior®, AIB. ácido indol-3-butírico, OB. origen de brote

4.5. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para el establecimiento de los experimentos de establecimiento, subcultivo, enraizamiento y aclimatación en tubetes. En el caso del experimento de inducción de enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* en tubetes, se utilizó un experimento factorial con arreglo completamente al azar de tres factores.

El número de repeticiones en el establecimiento de semillas *in vitro* con tratamientos de 0, 2.5, 5 mg L⁻¹ de BAP fue de 40. Las repeticiones en los experimentos de subcultivos con BAP fueron en SC1 60R, SC2 20R, SC3 21R, SC4 22R, SC4-1 22R, SC5 91-176R y SC5-1 26R.

En el establecimiento de semillas *in vitro* con 2.5, 5 mg L⁻¹ de BAP en combinación 0.1, 0.5 mg L⁻¹ de ANA fueron 40 repeticiones para cada tratamiento y el testigo. Las repeticiones en el SC1 fueron 68 y para el SC2 fueron 20.

En el caso de los experimentos de enraizamiento se tuvieron las siguientes repeticiones, enraizamiento *ex vitro* en tubete con Radix® 10000, 15 repeticiones; enraizamiento *in vitro* con AIB, 20 repeticiones y en inducción de enraizamiento *in vitro* y aclimatación en tubete se tuvieron 5 repeticiones.

4.6. Variables evaluadas

4.6.1. Establecimiento

Tanto en el establecimiento de BAP como en BAP+ANA las variables a evaluar fueron: número de raíces primarias (NR), longitud de raíz primaria más larga (LR) en cm, longitud de hoja más larga (LH) en cm y ancho de base tallo (ABT) en cm a 30 y 60 días; número de brotes (NB) y plántulas hiperhidratadas (HH) a los 40 días después de establecidas las semillas.

4.6.2. Multiplicación (subcultivos)

Los subcultivos, SC1, SC2 con BAP y SC1 con BAP+ANA las variables registradas fueron longitud de hoja más larga (LH) en cm, número de brotes (NB) y propágulos establecidos con hiperhidratación (HH) a los 30 días de establecidos y en el caso del SC2 se añadió el número de raíces adventicias (NR) y la longitud de raíz más larga adventicia (LR) en cm a los 30 días de iniciado el subcultivo.

En los subcultivos SC3, SC4 (brotes sanos), SC4-1 (brotes hiperhidratados), SC5 y SC5-1 se registraron a los 30 días, las variables longitud de hoja más larga (LH) en cm, ancho de base de tallo (ABT) en cm, número de brotes (NB), número de raíces (NR), longitud de raíz adventicia más larga (LR) en cm y propágulos con hiperhidratación (HH), propágulos con hiperhidratación inicial (HHI).

4.6.3. Enraizamiento y aclimatización

4.6.3.1. Enraizamiento *ex vitro* en tubete

Las variables a evaluadas fueron número de raíces primarias generadas al día 80 (NR), Longitud de la raíz primaria más grande (LR) en cm, porcentaje de brotes supervivientes con raíz al día 80 (PBR).

4.6.3.2. Enraizamiento *in vitro*

Las variables evaluadas fueron longitud de hoja más larga (LH10) en cm en los primeros 10 días de iniciado el experimento en el medio de enraizamiento, ancho de base de tallo (ABT) en cm de los brotes a 10 días en el medio de enraizamiento, número de raíces formadas al día 40 (NR), longitud de la raíz adventicia más larga (LR) en cm y porcentaje de brotes enraizados a 40 días (PBR) en medio de enraizamiento.

4.6.3.3. Inducción enraizamiento *in vitro* y aclimatización en tubete

Se registró el porcentaje de supervivencia de los brotes que formaron raíz (PBCR) al día 60.

El análisis de los datos de las variables registradas se realizó mediante RStudio, se realizaron ANOVAs, comparación de medias Tukey a 0.05 de significancia, para casi todos los experimentos a excepción de las variables binomiales que fueron las que tuvieron valores 0 fracaso y 1 para éxito de la variable registrada, estas últimas se analizaron mediante Regresión Logística y comparación de medias emmeans Tukey con 0.05 de significancia. En establecimiento *in vitro* estas fueron porcentaje de contaminación a 10 días (PC10), porcentaje de germinación a los 30 días (PG30), porcentaje de plántulas con desarrollo anormal (PDA30) tanto en el establecimiento con BAP como en BAP+ANA fueron analizadas como variables binomiales, los resultados sólo fueron informativos ya que nuestro objetivo principal fue el subcultivo. Las variables binomiales en subcultivo fueron porcentaje de brotes con raíz (PBR), porcentaje de hiperhidratación del brote propágulo (PHH) a los 30 días de subcultivo. En enraizamiento *in vitro* la variable binomial fue porcentaje de brotes con raíz (PBR) a 40 días en medio de enraizamiento. Para el caso de enraizamiento *ex vitro* fue el porcentaje de brotes

supervivientes (PBR) con raíz al día 80 después de trasplante y finalmente los brotes con inducción *in vitro* de enraizamiento y aclimatación al día 60 la variable binomial fue porcentaje de brotes enraizados (PSBR60) al día 60.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Establecimiento *in vitro* de semillas *C. hookeri* con BAP

Se realizaron varios establecimientos piloto con 10 semillas, las semillas estaban almacenadas en condiciones ambientales, sin ningún tratamiento previo, se siguieron los protocolos de desinfestación publicados por Guillen *et al.* (2015); Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005); Reyes-Silva *et al.* (2013), pero los porcentajes de contaminación fueron del 80%. Hay antecedentes del ácido sulfúrico para escarificar, para nosotros fue el componente del proceso de desinfestación que permitió pudiéramos establecer las semillas *in vitro*, a una concentración 4N. El porcentaje de contaminación que se obtuvo al establecer el experimento fue del 5.8 % de forma general, el testigo fue el que tuvo el mayor porcentaje de contaminación evaluado a 10 d (cuadro 5.1.).

Para la variable PG30, se contabilizaron sólo los tubos de ensayo sin contaminación, los tres tratamientos alcanzaron el 100% (cuadro 5.1) de germinación, se consideraron como germinadas las semillas que mostraron 0.1 cm de longitud de raíz. La germinación se observó a partir del día 5. Al día 10 el tratamiento con más alto porcentaje de germinación (97.4%) fue el tratamiento con 5 mg L⁻¹ de BAP, el segundo fue el tratamiento sin fitohormona (94.4%) y el último (84.2%) fue con 2.5 mg L⁻¹ de BAP, sin embargo, todos los tratamientos registraron el 100 % de germinación a los 20 días de establecidos.

Las plántulas con hiperhidratación, fueron aquellas que mostraron aspecto vidrioso, longitud de hoja diferente a plántulas normales, así como color verde claro. El tratamiento con mayor hiperhidratación (28% de los propágulos) fue 5 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.1.). La presencia de raíces en semillas de *C. hookeri* se observaron a partir de los 10 días, la variable LR fue significativa ($P < 0.0001$). A los 10, 20 y 30 días, la máxima longitud de raíz (7.94 cm) se obtuvo con semillas germinadas en medio sin reguladores de crecimiento, a 30 días del establecimiento (cuadro 5.2).

Cuadro 5. 1. Establecimiento *in vitro* de semillas de *C. hookeri*, porcentajes de contaminación, germinación, emergencia e hiperhidratación.

Tratamiento BAP	PC10 [†]	PG30 [¶]	PE40 [§]	PHH40 ^b
mg L ⁻¹				
0	5.00a	100.00a	100.00a	3.00a
2.5	3.00a	100.00a	100.00a	5.00ab
5	10.00a	100.00a	94.00a	28.00b
*	0.35	1.00	0.12	0.001

†PC10: porcentaje de contaminación a los 10 días; ¶PG30: porcentaje de germinación al día 30; §PE40: porcentaje de emergencia a los 40 días de establecidas; bHH40: porcentaje de hiperhidratación a los 40 días; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

El porcentaje de semillas emergidas no fue significativo, el porcentaje más bajo (94%) fue el tratamiento 5 mg L⁻¹ BAP. Las semillas mantuvieron su capacidad de germinar y emerger en todos los tratamientos a pesar de haber sido cosechadas 14 meses antes de su establecimiento. Esto coincide con Rosa *et al.* (2014) quienes reportan que en *B. recurvata* no se vio afectado el porcentaje de emergencia a pesar de que las semillas estaban almacenadas un año antes de su germinación en condiciones medio ambientales. También coincide con Rodríguez Trejo *et al.* (2019) quienes al germinar semillas de *B. gracilis* con un año de almacenamiento reportaron un 89.3% de germinación.

Cuadro 5. 2. Respuesta a concentraciones de BAP en el establecimiento de semillas de *C. hookeri in vitro* en el número y la longitud de raíces.

Tratamiento	NR10 [†]	LR10 [¶]	NR20 [§]	LR20 ^b	NR30 [¶]	LR30 ^{††}
mg L ⁻¹ BAP						
0	0.94a	0.94a	1.02a	5.60 ^a	1.66a	7.94 ^a
2.5	0.84a	0.31c	1.00a	1.55b	1.00b	2.54b
5.0	0.97a	0.74b	1.00a	1.72b	0.97b	2.19b
*	0.082*	7.26x10 ⁻¹²	0.346	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶

†NR10: número de raíces a los 10 días; ¶LR10: longitud de raíz a los 10 días; §NR20: número de raíces primarias a los 20 días; bLR20: longitud de raíz primaria a los 20 días; ¶NR30: número de raíces a 30 días; ††LR30: longitud de raíces a 30 días; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

El NR no fue significativa hasta el día 30 (1.66 raíces) en el tratamiento testigo (0 mg L⁻¹ BAP) (cuadro 5.2). Cabe señalar que además de tener la mayor LR y el mayor NR fue también el único tratamiento con raíces secundarias.

Los brotes con hojas más largas fue el tratamiento de plántulas germinadas a 0 mg L⁻¹ BAP a los 30 y 60 días (7.91 y 16.61 cm) respectivamente (cuadro 5.3).

Las bases de tallo más anchas se registraron en 5 mg L⁻¹ BAP a los 30 días (0.62 cm) y las más delgadas (0.43 cm) en 0 mg L⁻¹ (cuadro 5.3).

El número de brotes fue mayor (4.60 brotes por propágulo) a 5 mg L⁻¹ (cuadro 5.3. y figura 5.1 B y C) lo que es contrastante con lo reportado con Núñez *et al.* (2021) quienes reportaron 26 brotes por propágulo en plántulas sometidas a esta misma concentración.

Cabe señalar que el tamaño de los brotes no es homogéneo ya que se desarrollan brotes más grandes y otros más pequeños, los brotes mayores a 1 cm son los tienen capacidad para desarrollarse más rápido que aquellos que son menores de esta longitud y una vez separados de la planta madre (plántula germinada de semilla) les costará más desarrollarse. No hubo significancia en el porcentaje de brotes propágulo que tuvieron la capacidad de generar brotes cuando se les colocó en concentraciones de BAP, el tratamiento 5 mg L⁻¹ fue el que tuvo el mayor porcentaje (83 %). Una desventaja es la hiperhidratación, ésta variable fue significativa (valor-*P*: 0.001), el tratamiento 5 mg L⁻¹ BAP tuvo 28% de hiperhidratación (cuadro 5.1, figura 5.1 E) pero también se presentó en 2.5 mg L⁻¹ (figura 5.1.F).

Cuadro 5. 3. Respuesta a concentraciones de BAP en establecimiento de semillas de *C. hookeri in vitro*, longitud de hoja, ancho de hoja y número de brotes.

mg L ⁻¹ BAP	LH30† (cm)	LH60¶ (cm)	ABT30§ (cm)	ABT60¶ (cm)	NB60ª	NB70††	PCB70
0	7.91 ^a	16.61 ^a	0.43 ^b	0.70 ^b	0.00 ^b	0.10 ^b	3.00 ^b
2.5	2.63 ^b	4.05 ^b	0.58 ^a	0.82 ^{ab}	0.47 ^{ab}	2.55 ^a	77.00 ^a
5.0	2.27 ^b	3.18 ^b	0.62 ^a	0.89 ^a	1.50 ^a	4.60 ^a	83.00 ^a
*	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	2.0x10 ⁻⁰⁹	0.02	0.01	1.77x10 ⁻⁰⁵	8.2x10 ⁻¹³

†LH30: longitud de hoja más grande a 30 días; ¶LH60: a 60 días; §ABT30: ancho de base a 30 días; ¶ABT60: ancho base tallo 60 días; ªNB60: número de brotes 60 días; ††NB70: número de brotes a 70 días; ¶¶PB: porcentaje de propágulos con brotes; *: valor de *P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey (*p* ≤ 0.05).

El número de brotes en 2.5 mg L^{-1} de plántulas germinadas *in vitro* vario desde 1 a 12 brotes por planta; en el caso de 5 mg L^{-1} vario de 1 hasta 16 brotes. Las semillas son propágulos variables y no tiene la misma respuesta a las concentraciones de BAP. Los resultados difieren con Núñez *et al.* (2021) quienes reportaron hasta 26 y 18 brotes por plántula generada *in vitro* a concentraciones de 2.5 y 5 mg L^{-1} y no reportan hiperhidratación en estas concentraciones de BA. Con respecto a las plántulas germinadas se utilizó el medio desde que se establecieron (80 días). Se coincidió con el tiempo en que se realizó la evaluación, con 2.5 y 5 mg L^{-1} BAP a 28 días y se cambiaron a un nuevo medio con las mismas concentraciones donde se evaluaron al día 60, por lo que tenían el explante 88 días cuando se evaluó el número de brotes. Por el contrario, Vadillo-Pro *et al.* (2016) reportaron como mejor tratamiento $0.45 \text{ }\mu\text{M}$ (0.1 mg L^{-1}) TDZ, el que generó mayor número de brotes (25.82 brotes), con respecto a 2.3 y $4.5 \text{ }\mu\text{M}$ (0.5 y 1 mg L^{-1}) TDZ, (23.38 y 22.57 brotes por explante) sin diferencias significativas entre estos tratamientos, pero si hubo diferencia con la citocinina BA, que su mejor tratamiento $13.3 \text{ }\mu\text{M}$ (3.0 mg L^{-1}) generó un número inferior (6.74 brotes por explante), no se presentaron diferencias significativas con 4.4 y $22.2 \text{ }\mu\text{M}$ (1 y 5 mg L^{-1}) BA en cuanto al número de brotes (3.53 y 5.67 respectivamente) y el número de brotes es mayor a los obtenidos en este experimento.

Vadillo-Pro *et al.* (2016) reportaron hiperhidratación, en los tratamientos enriquecidos con 0.45 y $2.3 \text{ }\mu\text{M}$ (0.1 y 0.5 mg L^{-1}) de TDZ (con 4.38 y 7.21 brotes hiperhidratados por explante respectivamente) y en $22.2 \text{ }\mu\text{M}$ (5 mg L^{-1}) BA (3.62 brotes hiperhidratados por explante), aunque también se presentó en los demás tratamientos, donde las medias de brotes hiperhidratados fue baja. Así también Núñez *et al.* (2021) reportó que tuvieron 180 brotes que dejaron de crecer y no continuaron su desarrollo, algunas de ellas estaban deformadas, posiblemente por hiperhidratación y sin producción de brotes. El origen de estos brotes fue de semillas germinadas en 2.5 , 5.0 y 7.5 mg L^{-1} de citocininas (TDZ; BA y KIN) y posteriormente las plántulas a los 28 días de establecidas fueron subcultivadas en estas mismas concentraciones, 7 mg L^{-1} fue la concentración y el tipo de citocinina que provocó la deformación de brotes en etapa de multiplicación.

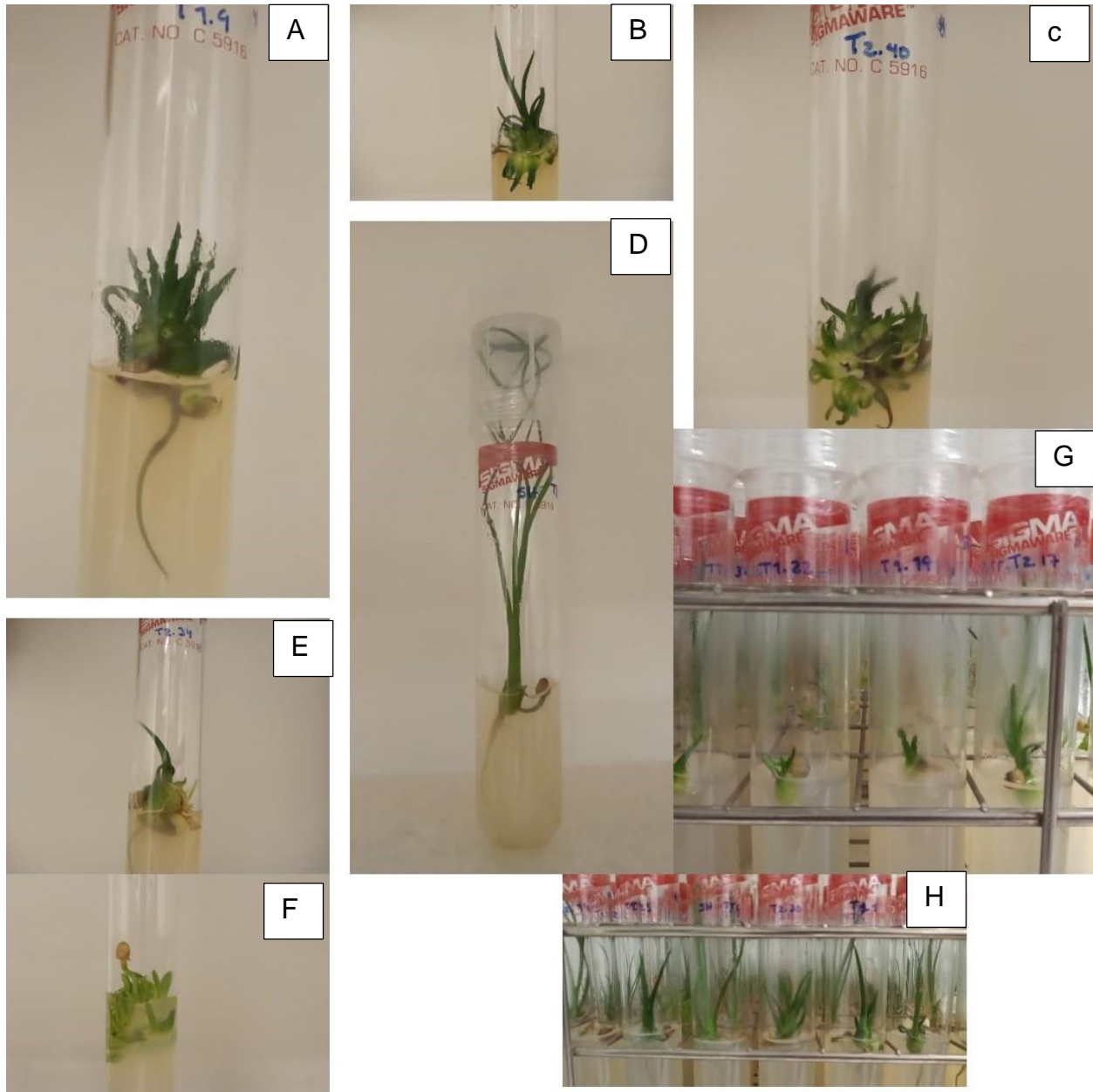


Figura 5. 1. Plantas de *C. hookeri* a 60 días de establecidas en BAP, brotes sanos e hiperhidratados. A. 2.5 mg L⁻¹ R9; B. 5 mg L⁻¹ R38; C. 5 mg L⁻¹ BAP R40; D. 0 mg L⁻¹ R8 brotes sanos; brotes hiperhidratados E. 5 mg L⁻¹ BAP R34 y F. 2.5 mg L⁻¹ R21; G. tratamientos BAP a los 30 días del establecimiento semillas *in vitro* de izquierda a derecha tratamiento 2.5, 5, 0 mg L⁻¹ BAP; H. tratamientos BAP a los 60 días del establecimiento semillas *in vitro*, de izquierda a derecha 0, 5, 2.5 mg L⁻¹.

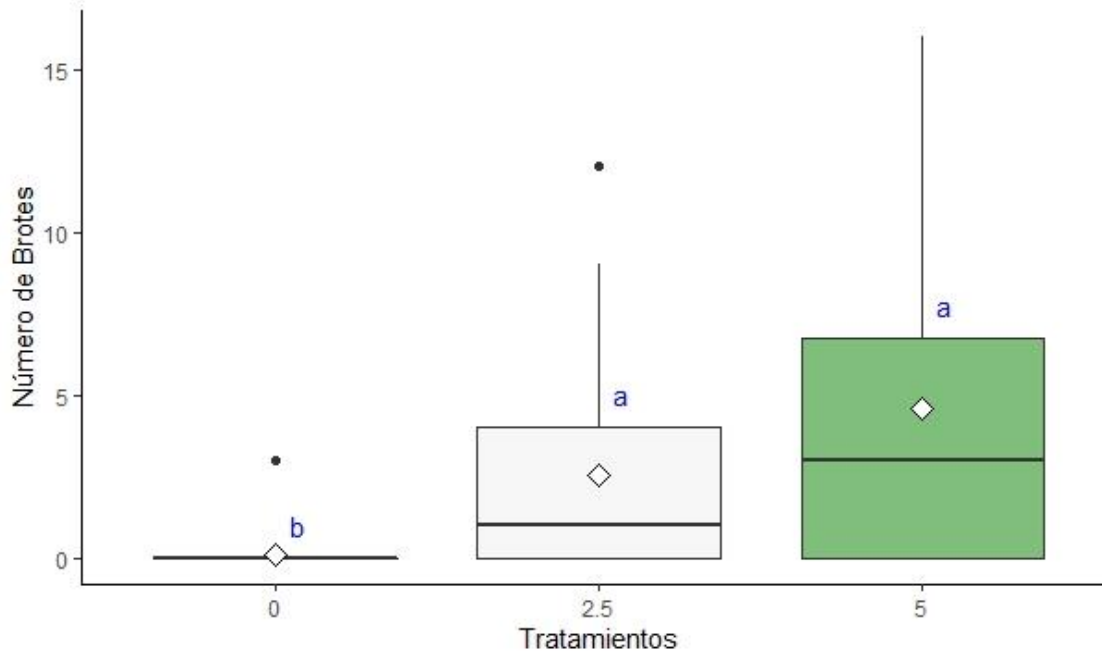


Figura 5. 2. Gráfica de cajas, número de brotes generados de *C. hookeri* a 70 días del establecimiento in vitro en concentraciones de BAP (mg L⁻¹).

Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) reportaron que el desarrollo del primer brote inhibió o limitó el desarrollo de brotes subsecuentes, esto explica la heterogeneidad observada para la altura de brotes de 0.3 hasta 10 cm en *B. recurvata* y *B. gracilis*, lo que coincide en este estudio, el material que se utilizó para los subcultivos es variable ya que los brotes generados algunos son de un largo de hoja más grandes y otros más pequeños.

5.2. Subcultivos con concentraciones de BAP

5.2.1 Primer subcultivo de brotes *C. hookeri*

Los brotes subcultivados tuvieron una respuesta baja a LH y NB debido a la hiperhidratación que los afectó. La longitud de hoja no fue significativa, el número de brotes fue significativo ($p \leq 0.05$). La concentración 2.5 mg L⁻¹, tuvo la mayor cantidad de brotes (1.88 brotes por propágulo), (cuadro 5.4. y figura 5.3.). La variable hiperhidratación fue significativa ($p \leq 0.001$). Los brotes subcultivados fueron más sensibles a 5 mg L⁻¹ BAP, produjo el porcentaje más alto de propágulos hiperhidratados (78.00 %), (cuadro 5.4.). Nuestros resultados coinciden con Millán-Soto *et al.* (2019) quienes reportaron que las concentraciones mayores de fitoreguladores aumentaron la hiperhidratación en *A.*

officinalis en el tejido de brotes en desarrollo. Así mismo Vadillo-Pro *et al.* (2016) indicaron que brotes hiperhidratados de *B. purpurea* al exponerlos a citocininas (TDZ, BA y KIN) en concentraciones más altas, generaron mayor número de brotes hiperhidratados.

Cuadro 5. 4. Respuesta de brotes de *C. hookeri* a concentraciones de BAP en el primer subcultivo (SC1) a los 30 días de inicio.

Tratamiento	LH† (cm)	NB††	PHH§
mg L ⁻¹ BAP			
2.5	1.74a	1.88 a	42.00a
5.0	1.64a	0.44b	78.00b
	0.793	0.0007	1.3X10 ⁻⁰⁵

†LH: longitud de hoja; ††NB: número de brotes; §PHH: porcentaje de hiperhidratación del brote propágulo; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Los trabajos realizados en el género *Beaucarnea* han contemplado la germinación de semillas en medio MS sin reguladores de crecimiento y posteriormente eliminan puntas de las hojas y raíces, dividen en tallo y a éste lo someten a los reguladores de crecimiento. En el caso de los brotes desarrollados se llevan a la etapa de enraizamiento.

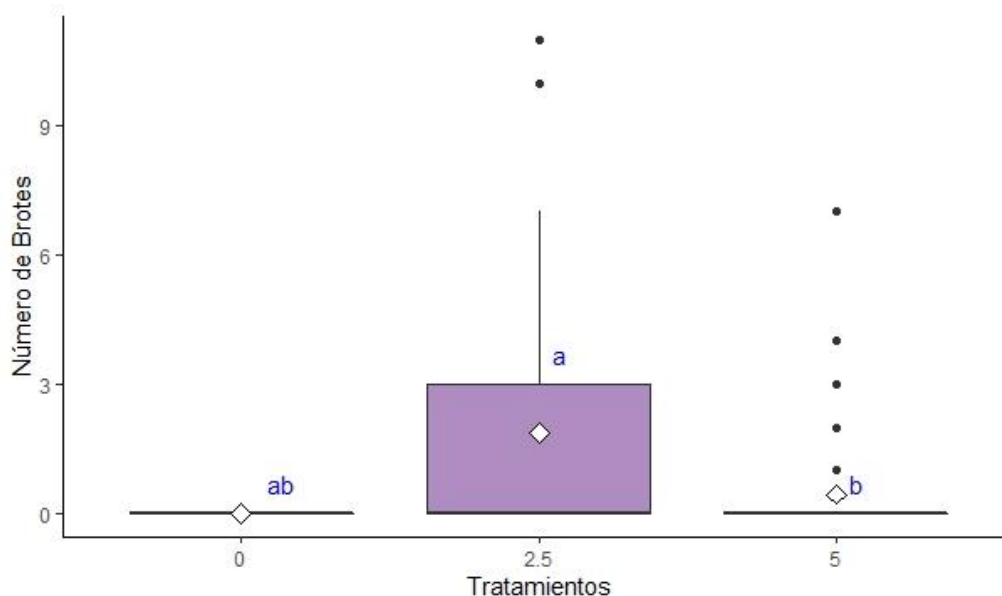


Figura 5. 3. Gráfica de cajas, número de brotes generados de *C. hookeri* a 30 días (SC1) en respuesta a diferentes concentraciones de BAP (mg L⁻¹).

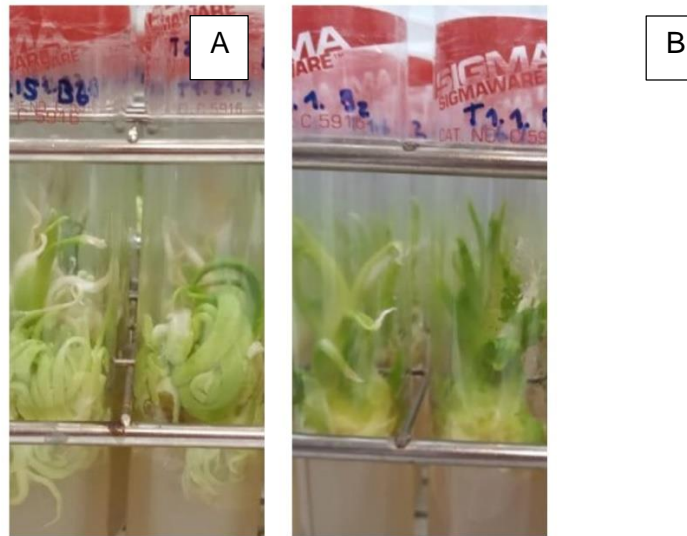


Figura 5. 4. Plantas afectadas por hiperhidratación a los 30 días, SC1. A. Propágulos del tratamiento 2.5 mg L^{-1} BAP; B. 5 mg L^{-1} BAP.

En este trabajo los hijuelos que fueron visibles al día 40 después de establecidas las semillas para su germinación, se subcultivaron a 2.5 y 5 mg L^{-1} BAP hasta el día 80 (permanecieron en el mismo medio), los brotes mostraron hiperhidratación al día 30 de subcultivo (figura 5.4). Las concentraciones de 2.5 y 5 mg L^{-1} BAP debido a que sufrieron daño al estar más de 30 días unidos a la planta madre, esto coincide con Daguin y Letouzé (1986) quienes registraron la actividad de la glutamato deshidrogenasa durante la inducción del proceso de vitrificación, la mayor diferencia en el nivel de actividad de la glutamato deshidrogenasa fue registrada en plantas de 42 días, aunado a que está relacionada con el nivel alto de nitrato de amonio en el medio MS ya que a partir de 6.25 mM NH_4^+ y $25.04 \text{ mM de NO}_3^-$ la actividad de esta enzima se incrementa.

5.2.2. Segundo subcultivo (SC2) de brotes de *C. hookeri*

La planta madre cuando se le separa de los primeros brotes, todavía tiene capacidad de generar más brotes, que con el cambio a un medio nuevo respondió desarrollando los brotes que estaban latentes, fue menor número comparado con la primera separación de brotes, hubo variabilidad en tamaño, no todos los brotes tienen la capacidad de ser subcultivados, es preferible dejar en la planta madre los que son menores de 2 cm y una vez que los más grandes han sido separados, los que se quedan en la planta tendrán oportunidad de desarrollarse en los próximos 10 días, que es cuando se notó una mayor

velocidad de crecimiento. Para este experimento, las plantas madre (establecidas *in vitro*) fueron subcultivadas a una concentración cinco veces menor de lo que tenían al establecimiento inicial (2.5 y 5 mg L⁻¹), 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ (segundo subcultivo), los brotes generados fueron subcultivados en un medio suplementado con 0.5 y 1 mg L⁻¹ BAP (SC2), las longitudes de hoja variaron de 1 a 2.34 cm, este dato se registró cinco días después del establecimiento y después de 40 días los brotes origen (BO) en 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ tuvieron las hojas más grandes (11.45 y 10.73 cm) los cuales fueron colocados en el medio testigo (0 mg L⁻¹ sin fitohormona) (cuadro 5.5), el tratamiento 0.5 mg L⁻¹ fue el tercer mejor tratamiento con hojas más largas (5.08 cm). La mayor cantidad de brotes (5.12 brotes por propágulo) se obtuvo en el tratamiento con 1 mg L⁻¹ (cuadro 5.5. y figura 5.5), esta concentración tiende a desarrollar brotes axilares de buen tamaño, pero las hojas más jóvenes tienden a ser verde claro con respecto de las demás hojas del brote. La mayor cantidad de raíces (2 raíces) se obtuvieron en los brotes de origen con 0.5 mg L⁻¹ BAP y el número fue menor (1 raíz) en los brotes que procedían de 1 mg L⁻¹ expuestos a 0 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.5). Es importante la generación de raíz, debido a que si se decide aclimatar el porcentaje de supervivencia se incrementa cuando los brotes tienen raíz. El porcentaje de brotes con raíz fue significativo (P≤0.001), en este subcultivo el testigo fue el mejor tratamiento con los OB que provenían de 0.5 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.5).

Cuadro 5. 5. Respuesta de brotes de *C. hookeri* a concentraciones de BAP en el segundo subcultivo (SC2)

Tratamiento	LH5 [†] (cm)	LH40 [¶] (cm)	NB5 [§]	NB40 [‡]	NR40 ^{¶¶}	PBCR	HH40 ^{¶¶¶}
mg L ⁻¹ BAP							
0	2.34 ^a	11.45 ^a	0.21a	0.31c	2.00a	84.00a	0.00a
0	1.19bc	10.73 ^a	0.20a	0.30c	1.00b	50.00ab	0.00a
0.5	1.53b	5.08b	0.16a	3.31b	0.24c	9.00bc	15.00a
1.0	1.00c	3.28c	0.19a	5.12a	0.01c	2.00bc	37.00a
	1.41x10 ⁻⁰⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	0.97	1.048x10 ⁻⁰⁹	2.2x10 ⁻¹⁶	3.2x10 ⁻⁰⁵	3.2x10 ⁻⁰⁵

†LH5: longitud de hoja más grande a 5 días; ¶LH40: a 40 días; §NB5: número de brotes al día 5 ; ‡NB40: número de brotes a los 40 días; ¶NR40: número de raíces adventicias principales a los 40 días; ††PBCR: porcentaje de brotes con raíz; ¶¶PHH40: porcentaje de hiperhidratación al día 40; *:valor-P; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey (p ≤ 0.05).

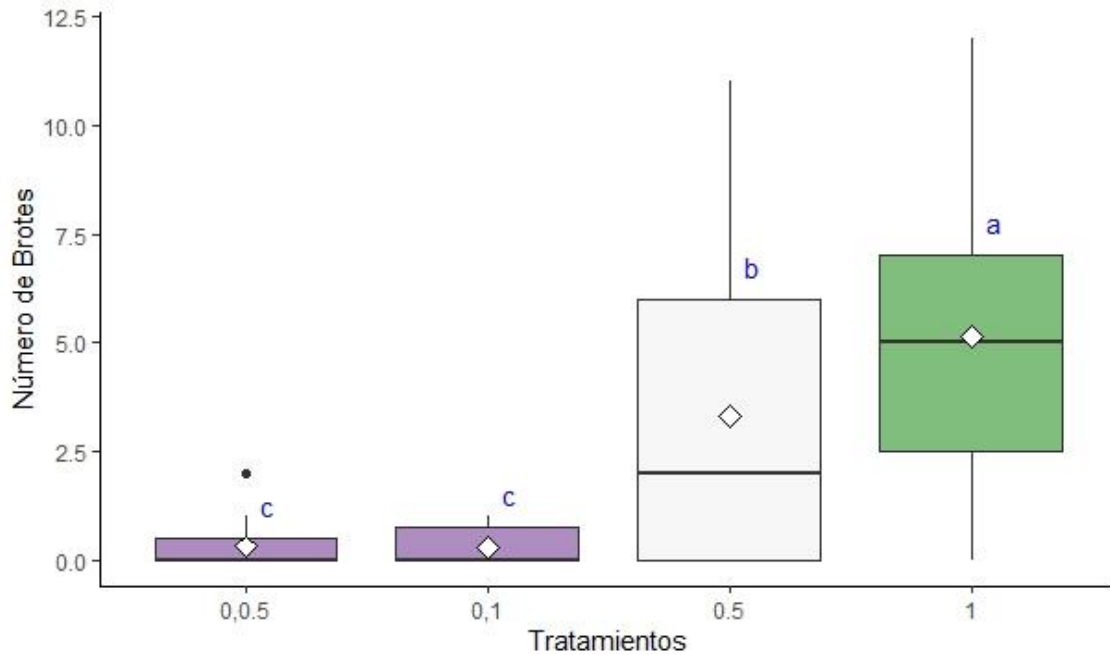


Figura 5. 5. Gráfica de cajas, respuesta de brotes a (mg L⁻¹) BAP, número de brotes generados de *C. hookeri* a los 40 días, SC2.

La variable hiperhidratación a los 30 días de subcultivo no fue significativa ($p \leq 0.05$), el porcentaje mayor de hiperhidratación (37%) se presentó en la concentración 1 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.5 y figura 5.6 D).

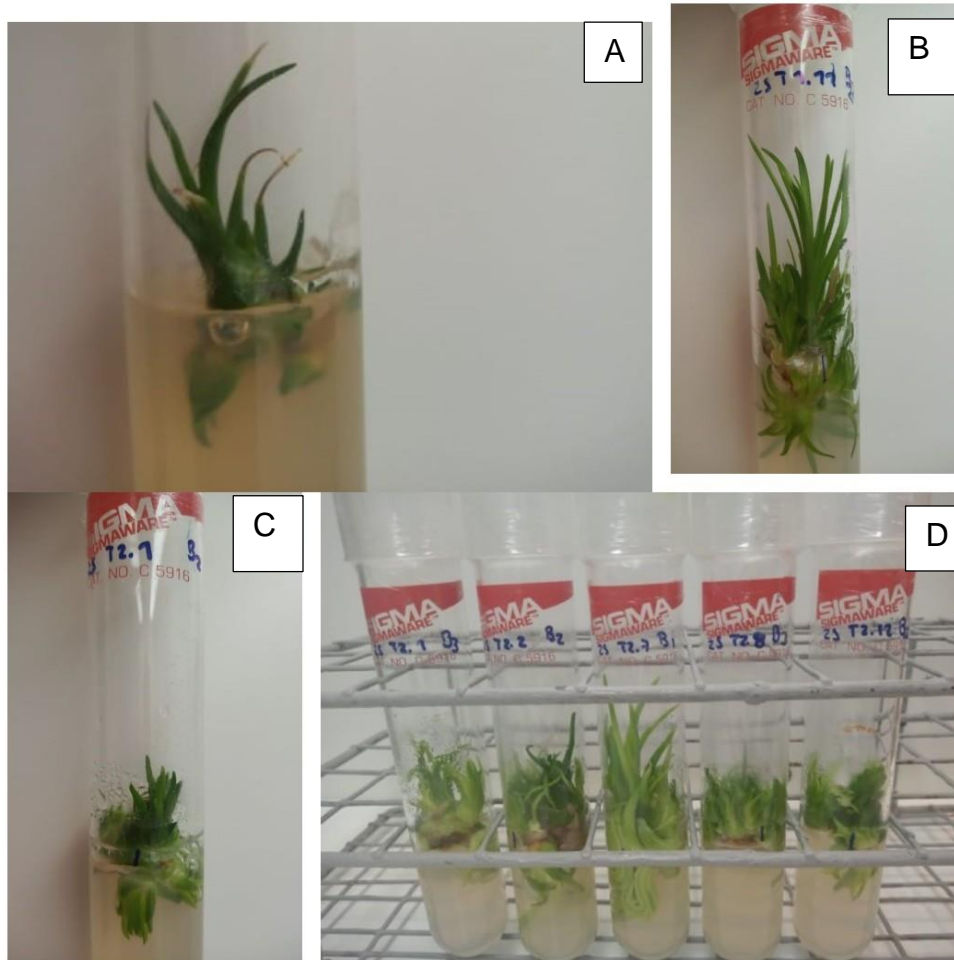


Figura 5. 6. Propágulos del SC2 en medio suplementado con BAP a los 30 días. A. 0.5 mg L⁻¹ propágulo y brotes, verde intenso; B. misma concentración que A, propágulos y brotes verdes claro; C. 1 mg L⁻¹ BAP propágulo y brotes sanos de tamaño similar color verde ligeramente claro y D. misma concentración que C, pero con ligera hiperhidratación base de tallos anchos y hojas con coloración verde claro.

5.2.3. Tercer subcultivo (SC3) de brotes *C. hookeri*

La formación de brotes adventicios en la base del tallo es una característica predominante con BAP, la variable NB fue significativa ($P \leq 0.0001$) entre los tratamientos suplementados con BAP y el testigo (0 mg L⁻¹). Entre los tratamientos con BAP no hubo diferencias significativas, aunque la mayor cantidad de brotes (6.35 y 5.71 brotes por propágulo) se registraron a 1.5 y 2.5 mg L⁻¹ BAP a los 30 días de subcultivo (cuadro 5.6 y figura 5.7). Estos resultados coinciden con Perales *et al.* (2020), quienes reportaron que en la etapa de multiplicación, utilizando como explante basal (eliminación de ápice

de hojas), medio MS (1962) y suplementado con 2.5 mg L⁻¹ BA, durante 90 días la especie *Beaucarnea recurvata*, fue la que generó el mayor número de brotes (5.7 brotes en promedio por explante), la segunda con mayor número de brotes fue *Nolina glaucophyllum* (5.6 brotes por explante). Así mismo, Vadillo-Pro *et al.* (2016) registraron 6.74 brotes por explante, inducidos en explantes de secciones longitudinales de *B. purpusii* a una concentración de 13.3. µM (3 mg L⁻¹) BA, sus resultados fueron ligeramente superiores a los obtenidos con 1.5 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.6). Así también Fontes Araujo *et al.* (2008) reportaron que en piña ‘Smooth Cayenne’ la más grande proliferación fue obtenida en ausencia de ANA y con 2.243 mg L⁻¹ de BAP sin embargo, en el tratamiento sin ANA y con 1 mg L⁻¹ BAP los brotes formados fueron más fuertes y fáciles para ser subcultivados. Por otra parte, Al-Saif *et al.* (2011) reportaron 2 mg L⁻¹ BAP como la mejor concentración para obtener el mayor número de explantes en la corona de piña, en el segundo subcultivo, y en estado vegetativo evaluado por dos meses. Así también Arimura *et al.* (2000) en jengibre (*Zingiber officinale*) informan que al evaluar concentraciones de BAP (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg L⁻¹) el BAP influyó en el número de brotes, con una respuesta máxima en 1 mg L⁻¹.

Cuadro 5. 6. Respuesta de brotes de *C. hookeri* originados en 0.5 mg L⁻¹ de BAP, expuestos a concentraciones de BAP del SC3 a 30 de iniciado

Tratamientos BAP mg L ⁻¹	LH [†] (cm)	NB [¶]	ABT [§] (cm)	NR [♯]	LR [⊠] (cm)	PBR ^{‡‡}	PHH ^{¶¶}
0.0	7.78 a	0.14b	0.39c	0.38a	1.34a	33.00a	10.00a
0.5	3.29b	4.33a	0.78b	0.00b	0.00b	0.00a	19.00a
1.0	2.30b	5.52a	1.01ab	0.00b	0.00b	0.00a	29.00a
1.5	2.09b	6.35a	1.04ab	0.00b	0.00b	0.00a	45.00a
2.0	2.56b	5.66a	1.19 ^a	0.00b	0.00b	0.00a	52.00a
2.5	1.94b	5.71a	1.14 a	0.00b	0.00b	0.00a	67.00b
*	2.2x10 ⁻¹⁶	9.7x10 ⁻⁰⁸	3.4x10 ⁻¹²	4.9x10 ⁻⁰⁷	2.1x10 ⁻⁰⁷	5.2x10 ⁻⁰⁵	0.0004

†LH: longitud de hoja más larga, cm; ¶NB: número de brotes; §ABT: ancho base de tallo, cm; ♯NR: número de raíces adventicias principales; ⊠LR: Longitud de raíz adventicia más larga; ‡‡PBR: porcentaje de brotes con raíz; ¶¶PHH: porcentaje de hiperhidratación del propágulo; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Osorio- Rosales y Mata-Rosas, (2005) reportaron que el explante de plántula sin raíz y sin hojas en *B. recurvata* y *B. gracilis* fue el que generó menor número de brotes y que fue mejor usar explantes de secciones longitudinales, los resultados obtenidos en la

presente investigación son similares al de secciones longitudinales, aunque se usó el brote completo, con la ventaja de que fue de fácil manejo y requirió tan sólo de 30 días para generar más brotes.

La longitud de hoja más larga entre tratamientos fue significativa ($P \leq 0.05$), las longitudes de hoja más largas (7.78 y 3.29 cm) se obtuvieron en 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.6 y figura 5.8).

El ancho de base de tallo entre tratamientos fue significativo ($P < 0.05$), las bases de tallo más anchas (1.19 y 1.14) se observaron en 2 y 2.5 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.6). El número de raíces y longitud de raíz más larga fue significativo para ambas ($P < 0.05$), la presencia de raíces (0.38) y la longitud (1.34 cm) sólo se presentaron en 0 mg L⁻¹ BAP, en los demás tratamientos no se formaron raíces (cuadro 5.6).

La variable respuesta hiperhidratación fue significativa ($P \leq 0.05$), Los tratamientos que tuvieron menor hiperhidratación fueron 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹ BAP (cuadro 5.6.).

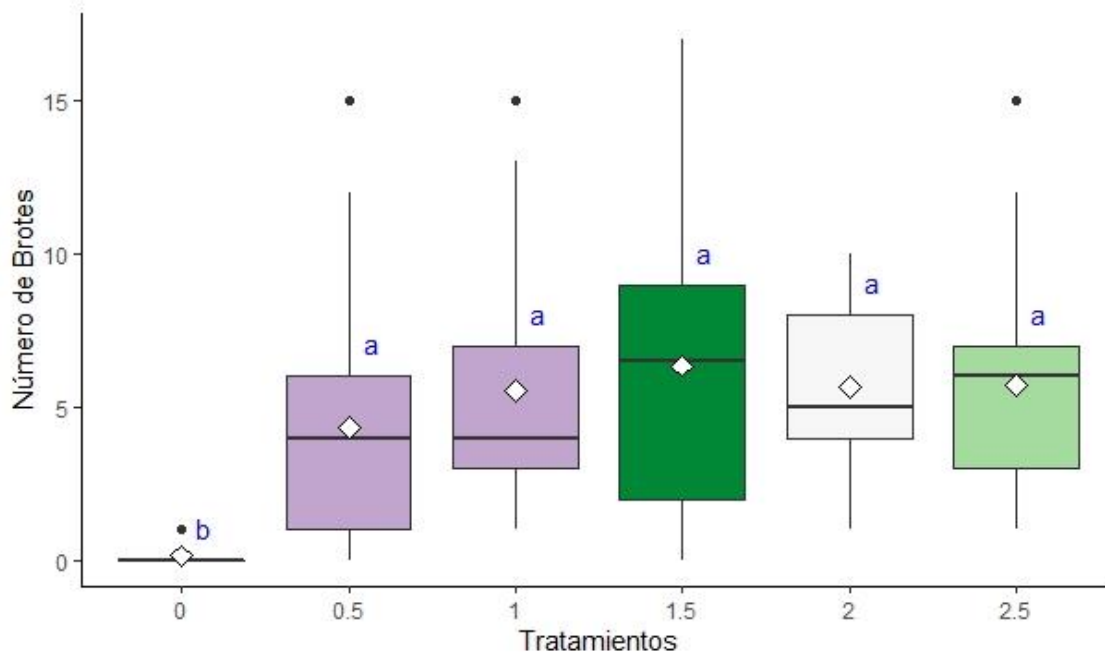


Figura 5. 7. Gráfica de cajas, número de brotes generados de *C. hookeri* a 30 días (SC3) en respuesta a diferentes concentraciones de BAP (mg L⁻¹).

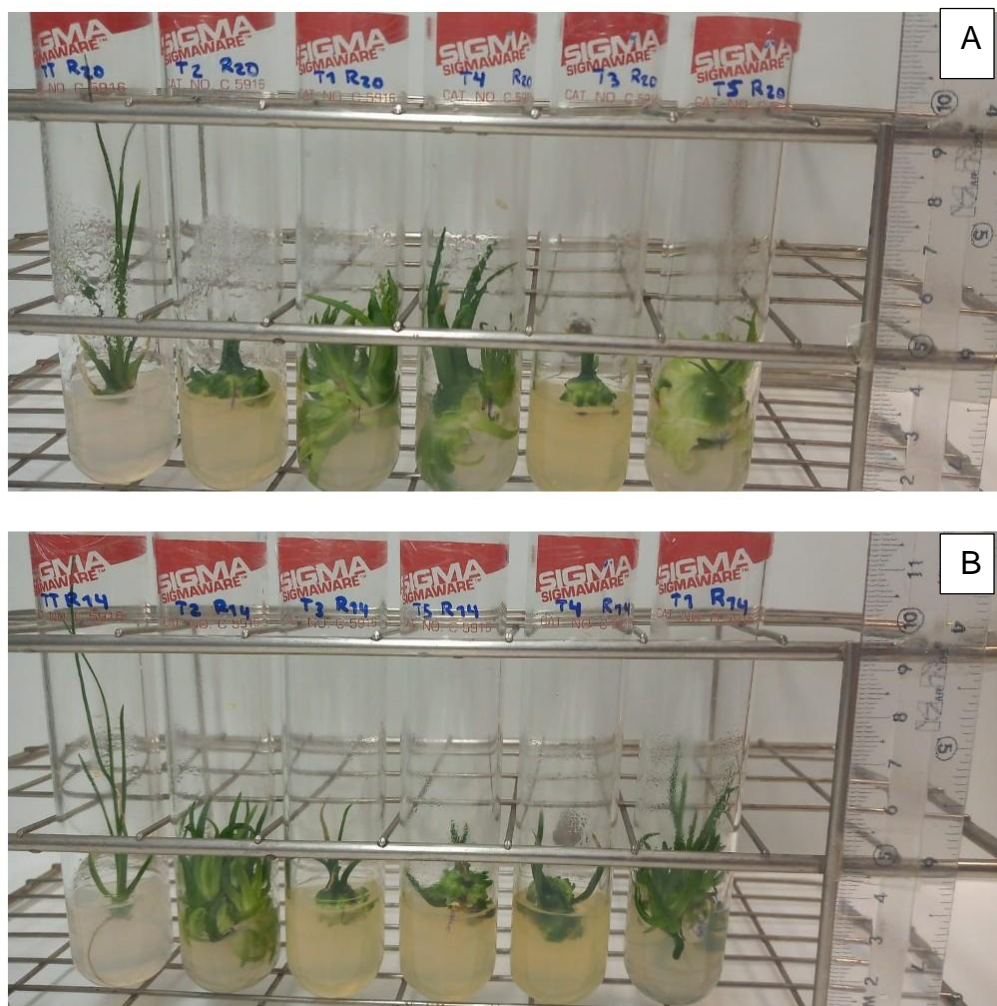


Figura 5. 8. Propágulos a 30 días de subcultivo, SC3. A. R20 de izquierda a derecha 0, 1, 0.5, 2, 1.5, 2.5 mg L⁻¹ BAP; B. R 14 de izquierda a derecha 0, 1, 1.5, 2.5, 2, 0.5 mg L⁻¹ BAP.

5.2.4. Cuarto subcultivo (SC4) de brotes sanos *C. hookeri*

La respuesta de brotes generados en 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ de BAP subcultivados a 0 y 0.5 mg L⁻¹ fue significativa para la longitud de hoja, ancho de base de tallo, número de brotes, número y longitud de raíces. La mayor longitud de hoja (10.22 cm), presencia de raíces (1.04) así como su longitud (3.25 cm), la base de tallo menos ancha (0.55 cm), se presentó en 0 mg L⁻¹ de BAP (cuadro 5.7).

Las bases de tallo más ancha (0.89 y 0.87 cm) se presentó a 1 y 2 mg L⁻¹ BAP origen de brote respectivamente y la base más delgada (0.55 cm) se obtuvo en 0 mg L⁻¹ BAP

(cuadro 5.7.). La mayor cantidad de brotes (9.7 brotes por propágulo) se obtuvo en 0.5 mg L⁻¹ origen de brote (cuadro 5.7., figuras 5.9 y 5.10.), el peor tratamiento fue (0.04 brotes por propágulo) de 0 mg L⁻¹ de BAP. Los resultados anteriores coinciden con lo reportado por Waly *et al.* (2018) quienes encontraron que en *B. recurvata* la concentración óptima fue de 0.4 mg L⁻¹ BAP en medio B5 para la etapa de multiplicación ya que incremento el número de brotes y el número de hojas.

Cuadro 5. 7. Respuesta de brotes sanos de *C. hookeri* con origen SC3, subcultivados 30 días a concentraciones 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP, SC4

Tratamientos		LH [†] (cm)	ABT [¶] (cm)	NB [§]	NR30 [¶]	LR30 [¶] (cm)	PBR ^{††}	PHH ^{¶¶}
BAP mg L ⁻¹	OB							
0	0.5	10.22 ^a	0.55 ^b	0.04 ^c	1.04 ^a	3.25 ^a	68.00 ^a	0.00 ^a
0.5	0.5	4.33 ^b	0.84 ^a	9.70 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	14.00 ^a
0.5	1.0	3.54 ^{bc}	0.89 ^a	7.37 ^{ab}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	18.00 ^a
0.5	1.5	3.03 ^{bc}	0.84 ^a	7.21 ^{ab}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	5.00 ^a
0.5	2.0	2.60 ^c	0.87 ^a	5.81 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	23.00 ^a
0.5	2.5	2.40 ^c	0.79 ^{ab}	6.09 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	5.00 ^a
	*	2.2x10 ⁻¹⁶	0.0012 **	5.06x10 ⁻¹²	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	7.1x10 ⁻¹³	0.051

OB: origen de brote SC3 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg L⁻¹; †LH: longitud de hoja más grande; ¶ABT: ancho base de tallo; §NB: número de brotes; ¶NR: número de raíces adventicias principales; ¶LR: Longitud de raíz adventicia más larga; ††PBR: porcentaje de brotes con raíz; ¶¶ PHH: porcentaje de hiperhidratación; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey (*P* ≤ 0.05).

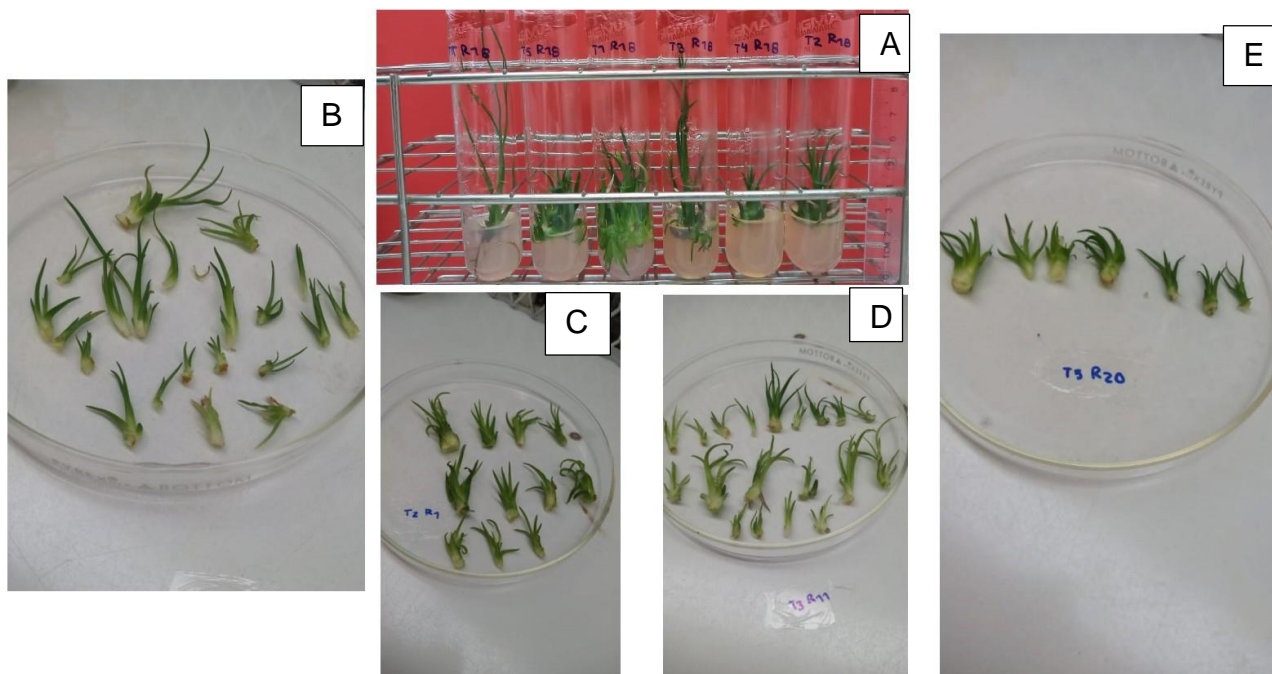


Figura 5. 9. Brotes generados en SC4 con una concentración de 0.5 mg L^{-1} de BAP asociado al origen de brote (OB). A. R18 de izquierda a derecha tratamientos 0, 2.5, 0.5, 1.5, 2, 1 mg L^{-1} BAP; B. 0.5 mg L^{-1} BAP; C. OB 1 mg L^{-1} BAP; D. OB 1.5 mg L^{-1} BAP; E. OB 2.5 mg L^{-1} BAP.

Ramírez-Gottfried *et al.* (2021) reportaron en la multiplicación de *Dasyllirion cedrosanum* que la concentración de 1 mg L^{-1} de BAP + 0.2 mg L^{-1} AIA en medio MS generó el mayor número de brotes (8.25 brotes por explante) resultados casi similares con el tratamiento 1 mg L^{-1} BAP origen de brote (7.37 brotes por propágulo), pero inferior a la concentración 0.5 mg L^{-1} la cual fue superior (9.7 brotes por propágulo) en *C. hookeri*.

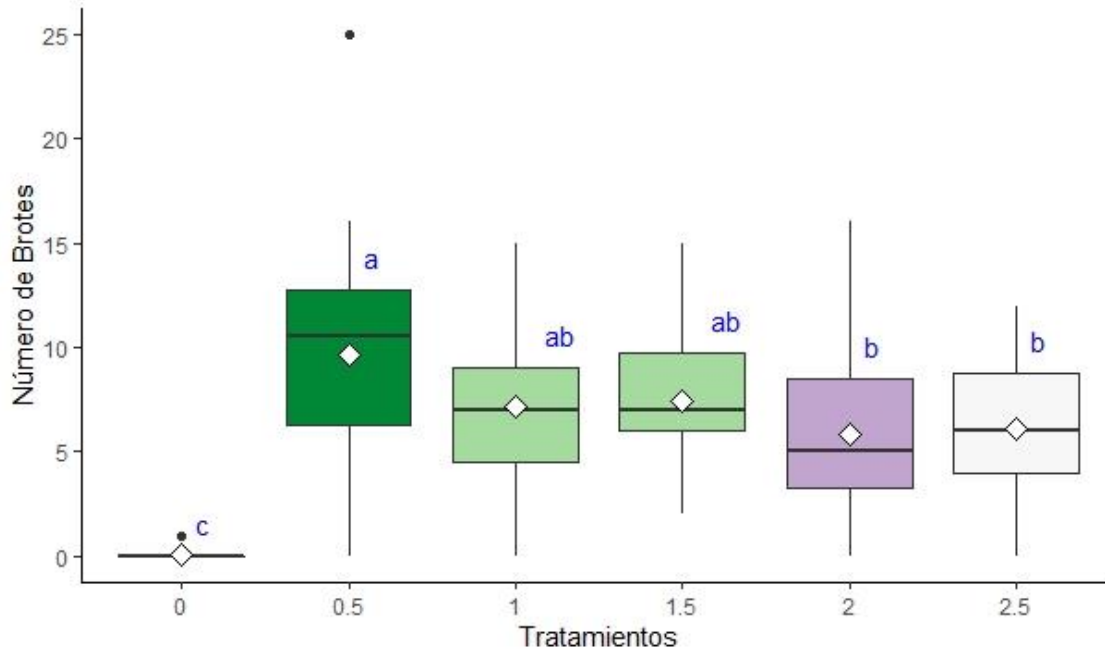


Figura 5. 10. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes sanos de *C. hookeri* a 30 días (SC4) en respuesta a 0.5 mg L⁻¹ de BAP

5.2.5. Cuarto subcultivo de brotes de *C. hookeri* con HHI (SC4-1)

Los brotes considerados con hiperhidratación inicial mostraron en hojas más jóvenes coloración verde claro a amarillo claro, característica de brotes sembrados en 1 mg L⁻¹ de BAP, en el caso de 1.5, 2 y 2.5, además de los síntomas anteriores, mostraron bases más anchas del brote propágulo, así como ligera deformación y menor cantidad de hojas (figura 5.12 B, C y E). La respuesta de los tratamientos con BAP (0, 0.5 y 1 mg L⁻¹) fue significativa ($P \leq 0.05$) para LH, ABT, NB, NR, LR y para NH (cuadro 5.8).

Los brotes sometidos a 0 mg L⁻¹ tuvieron la longitud de hoja más larga (6.78 cm), las bases menos anchas (0.31 cm), el menor número de hojas (6.90) y la menor cantidad de brotes (0.09 número de brotes por propágulo), pero sólo en este tratamiento se formaron raíces (0.71) no muy largas (1.44 cm), (cuadro 5.8). El testigo al no tener reguladores de crecimiento las hojas externas con ligera hiperhidratación se secaron, por ello quedo con menor cantidad de hoja y su vigor de la planta fue bajo. La pérdida de hojas hiperhidratadas fue una característica en el testigo, al respecto Millán-Soto *et al.* (2019) reportaron que la reducción de hiperhidratación en *Asparagus officinale* en 10.4 % se logró con la resiembra de rizomas en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Así mismo Vargas-Castillo y Abdelnour-Esquivel (2010) Encontraron hiperhidratación en porcentajes menores del 20% en los medios suplementados de 0 a 2 mg L⁻¹ de BAP.

La variable NB fue significativa ($p \leq 0.05$), en la concentración de 0.5 mg L⁻¹ (5.63 brotes por propágulo) no hubo diferencia significativa con la concentración 1 mg L⁻¹ (5.40 brotes por propágulo), (cuadro 5.8 y figura 5.11.). Los propágulos recuperados disminuyeron la producción de brotes.

Los tres tratamientos permitieron que el propágulo se recuperará de la hiperhidratación (figura 5.12 B. C.), aunque permanece un porcentaje de brotes no recuperados (cuadro 5.9.), se registró el mayor porcentaje en el testigo (23.80 %). Los brotes que se generaron fueron sanos, pero 0.5 mg L⁻¹ fue el mejor a los 30 días de subcultivo (figura 5.12. B, C, D, E).

Cuadro 5. 8. Respuesta en la recuperación de brotes con HHI origen del SC3,1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ de BAP y generación de brotes al día 30, subcultivo SC4-1.

Tratamiento BAP mgL ⁻¹	LH [†] (cm)	ABT [¶] (cm)	NB [§]	NR ^b	LR [¶] (cm)	PBR ^{††}
0.0	6.78a	0.31b	0.09b	0.71 ^a	1.44 ^a	43.00a
0.5	3.76b	0.66 ^a	5.63 ^a	0.00b	0.00b	0.00a
1.0	1.89b	0.74 ^a	5.40 ^a	0.00b	0.00b	0.00a
*	6.36x10 ⁻⁶	1.27x10 ⁻⁶	5.9x10 ⁻¹⁰	0.0003	0.0001	7.5x10 ⁻⁰⁶

†LH: longitud de hoja más grande; ¶ABT: ancho base de tallo; §NB: número de brotes; ¶NR: número de raíces adventicias principales; ¶LR: longitud de raíz adventicia más larga; ††PBR: porcentaje de brotes con raíz; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

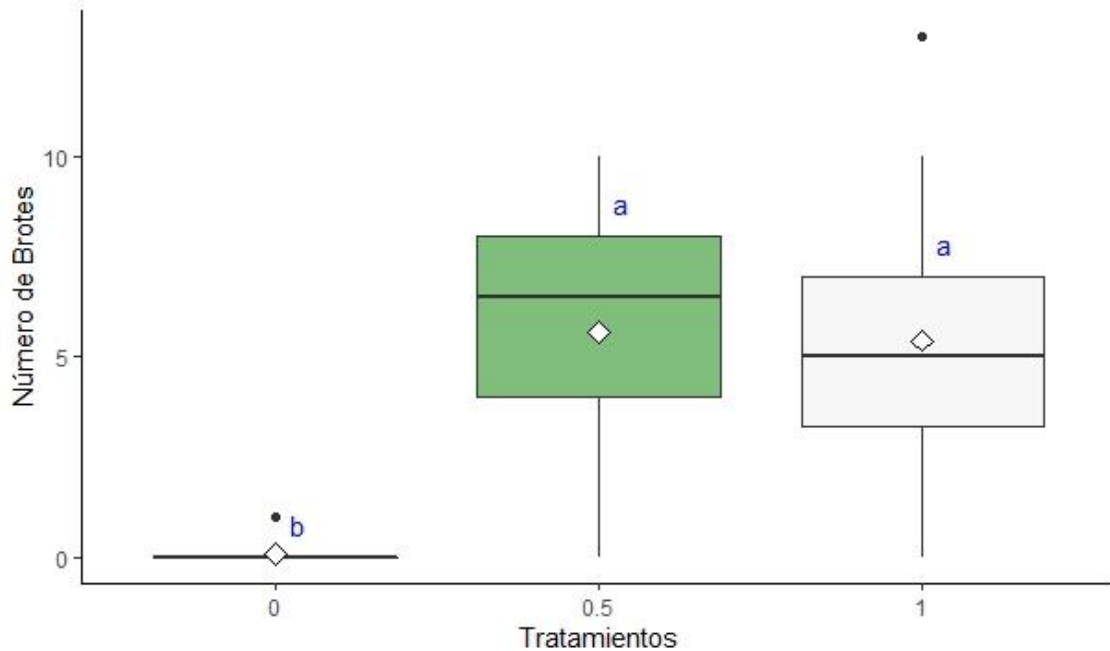


Figura 5. 11. Gráfica de cajas, respuesta de brotes de *C. hookeri* con sobrehidratación (HHI) a la generación de brotes en concentraciones de BAP (mg L^{-1}) 30 días de SC4-1.

Cuadro 5. 9. Respuesta a mg L^{-1} BAP en la recuperación de brotes de *Calibanus* a la HHI, evaluada a 5 y 30 días de subcultivo SC4-1.

HH	Trat	%	SE	Asymp.LCL	Asymp.UCL
5	0	95.20a	0.0465	72.90	99.30
	0.5	86.40a	0.0732	65.20	95.50
	1	90.90a	0.0613	70.000	97.70
	*	0.5917			
30	0	23.80a	0.0929	10.27	46.00
	0.5	18.20a	0.0822	6.99	39.60
	1	22.70a	0.0893	9.79	44.40
	*	0.890			

†HH: hiperhidratación a los 5 y 30 días; ¶PHH: porcentaje de hiperhidratación a 5 y 30 días; §SE: error estándar; p Asymp.LCL: límite inferior de un intervalo de confianza 0.95; ¤ Asymp.UCL: límite superior de un intervalo de confianza 0.95

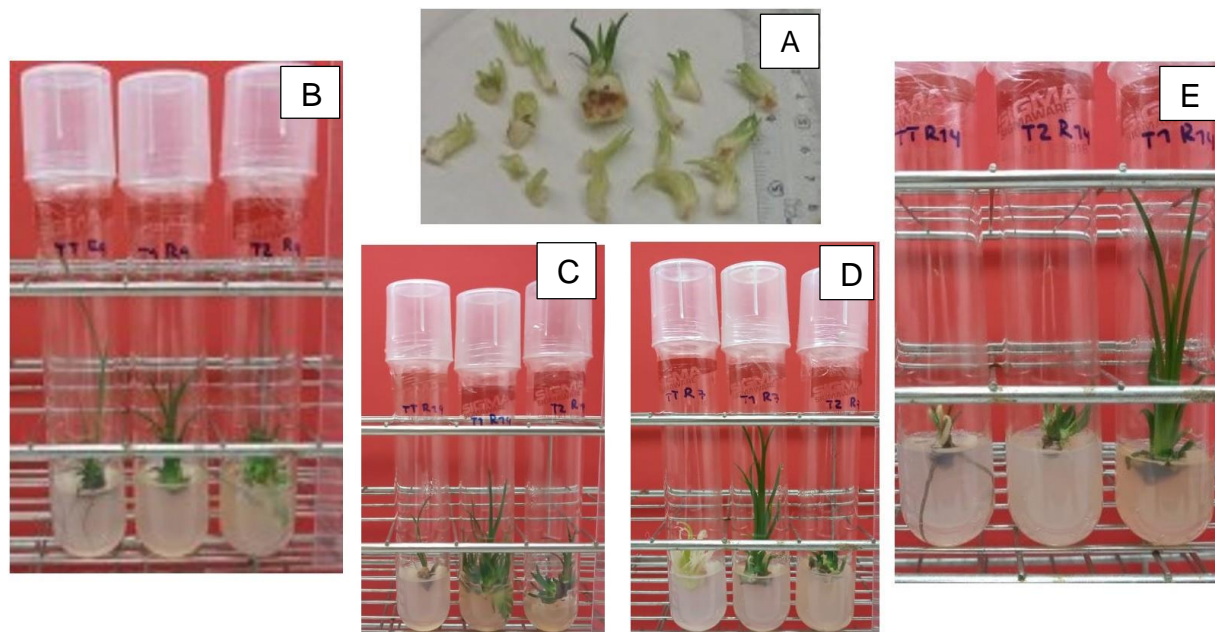


Figura 5. 12. Brotes propágulo y tratamientos del SC4-1. A. Brotes establecidos con hiperhidratación inicial (HHI) a 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹. B. brotes recuperados de la hiperhidratación inicial de izquierda a derecha 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹. C. Los tratamientos de izquierda a derecha 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹, el testigo sin raíz, menor cantidad de hojas y altura. D. tratamiento 0 mg L⁻¹ BAP, lado izquierdo no logró recuperarse de HHI. E. tratamientos de izquierda derecha 0, 1, 0.5, mejor tratamiento 0.5 mg L⁻¹ en la recuperación de HHI.

Ramírez-Gottfried *et al.* (2021), obtuvieron al usar como medio base (MS), (Murashige and Skoog, 1962), complementado con 1 mg L⁻¹ BAP + 0.2 mg L⁻¹ AIA, en etapa de multiplicación de *Dasyllirion cedrosanum*, 8.25 brotes por explante que es superior a lo que generó *C. hookeri*.

Los brotes colocados en medio sin reguladores fue el único tratamiento que generó raíces en Calibanus, lo que coincide con lo reportado con Puente-Garza, *et al.* (2015), quienes al utilizar brotes obtenidos en multiplicación en medio MS sin reguladores durante 30 días generaron raíces en *Agave salmiana*, lo que permitió una aclimatación exitosa de los mismos.

5.2.6. Quinto subcultivo (SC5) de brotes *C. hookeri*

Los brotes establecidos en este quinto subcultivo, fueron los brotes que se generaron en el cuarto subcultivo a una concentración de 0.5 mg L⁻¹ BAP y por segunda ocasión se colocaron en esta misma concentración (0.5 mg L⁻¹ BAP), pero conservando la

clasificación del brote que los originó desde el tercer subcultivo, siendo este el factor para establecer los tratamientos, se ocuparon todos los brotes generados por cada propágulo, a excepción de 48 brotes con origen de 0.5 y 38 de 1 mg con longitud de hoja de 2 cm aproximadamente que fueron establecidos en SC5-1. Se colocaron seis brotes en frasco con un volumen de 100 mL y con 20 mL de medio. Para el caso del establecimiento del testigo (0 mg L⁻¹ BAP) los brotes se tomaron de las concentraciones de origen de 0.5 y 1 mg L⁻¹ BAP y se colocaron dos brotes por frasco.

La respuesta por segunda ocasión a 0.5 mg L⁻¹ fue significativa ($P \leq 0.05$) para las variables LH, ABT, NB, NR y LR a los 30 días de subcultivo en frasco. Los brotes sin hormona (0 mg L⁻¹) fueron los que tuvieron la longitud de hoja más larga (4.59 cm), la base de tallo menos ancha (0.26 cm), la menor cantidad de brotes (0.23 brotes por propágulo, figura 5.13.) y fue el único tratamiento con presencia de raíces (0.57 raíces) de longitud corta (1.86 cm, cuadro 5.10).

Las bases de tallo más anchas se obtuvieron en 2.5 y 2.0 mg L⁻¹ de origen (0.55 cm y 0.49 cm, cuadro 5.10.). La mayor cantidad de brotes por propágulo se obtuvo en 0.5 y 1.5 mg L⁻¹ (6.19 y 5.12 brotes por propágulo; cuadro 5.10 y figura 5.13). Los brotes expuestos a BAP (OB 0.5 a 2.5 mg L⁻¹) no generaron raíces (cuadro 5.10.). Los brotes propágulo con ligera hiperhidratación, bases de tallo superiores a 0.6 cm y una ligera rugosidad en hojas, a pesar de que se presentó no hubo diferencia significativa entre tratamientos, los porcentajes más altos se presentaron en 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ de origen de brote (cuadro 5.10).

Cuadro 5. 10. Respuesta de brotes de *C. hookeri* a 0.5 mg L⁻¹ BAP, por segunda ocasión, con seguimiento origen de brotes del SC3, a 30 días de SC5.

Tratamiento		LH [†]	ABT [¶]	NB [§]	NR [‡]	LR [⌘]	PBR ^{††}	HH30 ^{¶¶}
BAP mg L ⁻¹	OB	(cm)	(cm)			(cm)		
0.5 y								
0	1.0	4.59 a	0.26 c	0.23 c	0.57 a	1.86 a	46.00a	4.00a
0.5	0.5	3.35 b	0.47 b	6.19 a	0.00 b	0.00 b	0.00a	1.00a
0.5	1.0	2.64 c	0.46 b	3.03 b	0.00 b	0.00 b	0.00a	1.00a
0.5	1.5	2.76 c	0.47 b	5.12 a	0.00 b	0.00 b	0.00a	3.00a
0.5	2.0	2.62 c	0.49 b	2.80 b	0.00 b	0.00 b	0.00a	6.00a
0.5	2.5	2.95 bc	0.55 a	3.95 b	0.00 b	0.00 b	0.00a	9.00a
*		9x10 ⁻¹⁰	8 x 10 ⁻¹⁵	2x 10 ⁻¹⁶	2x 10 ⁻¹⁶	2 x 10 ⁻¹⁶	2x 10 ⁻¹⁶	0.023

OB SC3: origen de brotes, subcultivo tres; †LH: longitud de hoja más grande; ¶ABT: ancho base de tallo; §NB: número de brotes; ‡NR: número de raíces adventicias principales; ⌘LR: longitud de raíz adventicia más larga; ††PBR: porcentaje de brotes con raíz; ¶¶PHH30: porcentaje de hiperhidratación al día 30; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

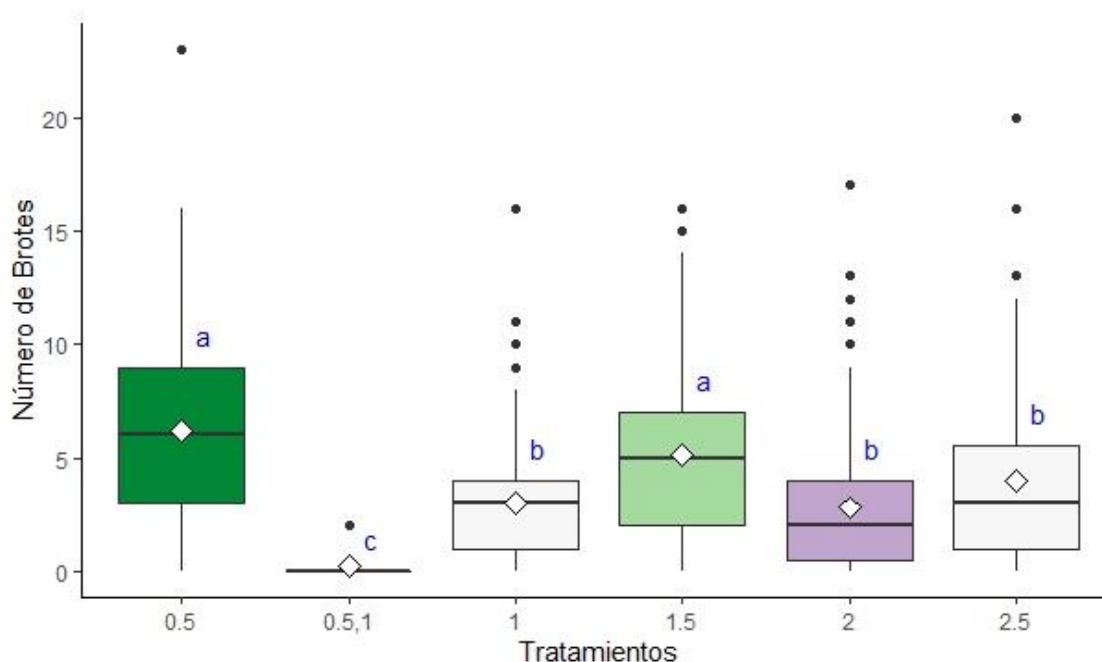


Figura 5. 13. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes de *C. hookeri* a 30 días (SC5) en respuesta a 0.5 mg L⁻¹ de BAP.

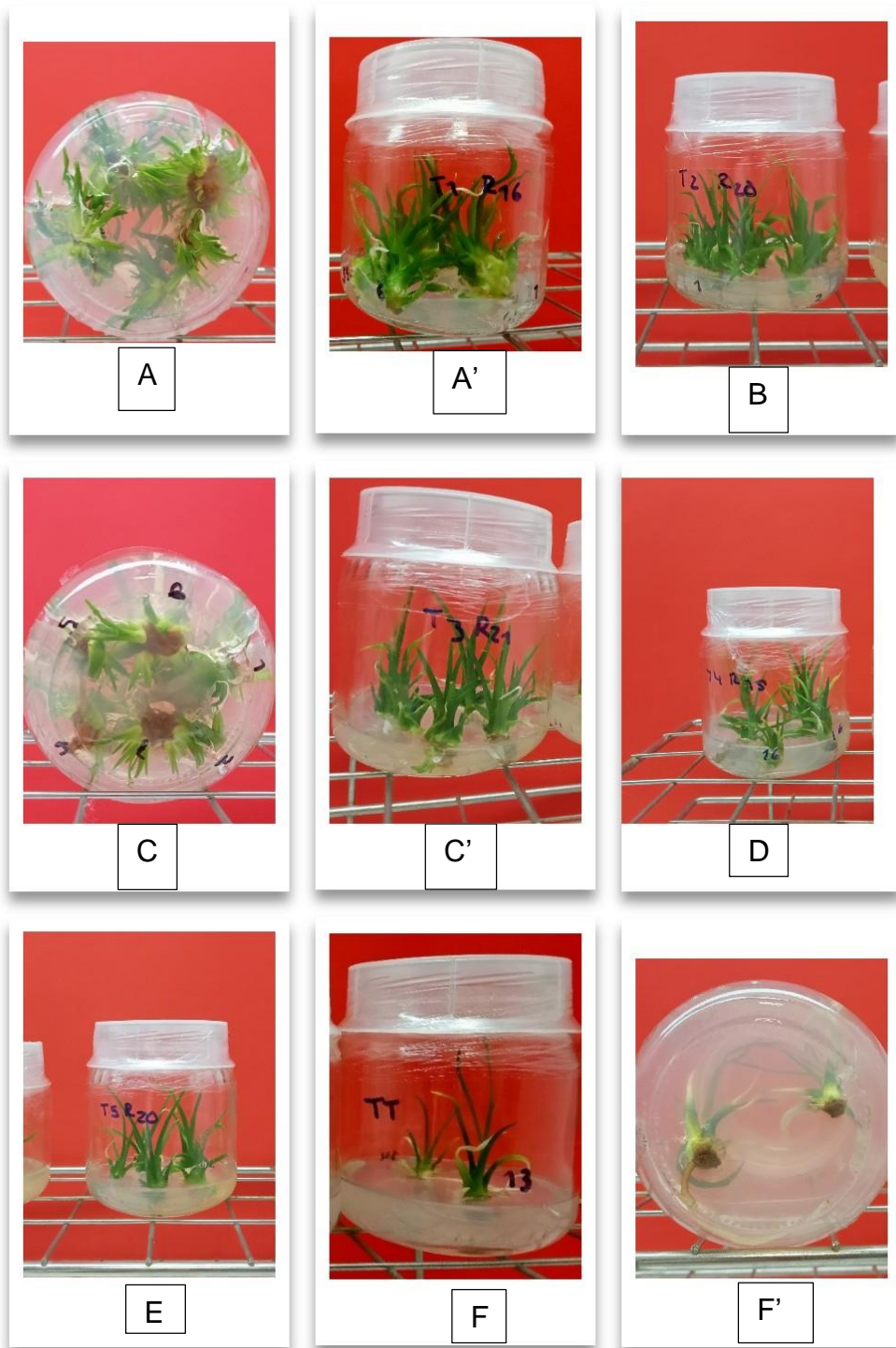


Figura 5. 14. Tratamientos del SC5, propágulos origen de brote (OB) mg L⁻¹ BAP colocados en medio suplementado con 0.5 y 0 mg L⁻¹ de BAP al día 30. A y A' OB 0.5; B. OB 1; C y C'. OB 1.5; D. OB 2; E. OB 2.5; F y F'. 0.5 (testigo).

Al colocar seis brotes por frasco durante 30 días no fue problema, para mantener hojas largas ya que, en el largo de hoja, fue menor a 5 cm (sin reguladores) y el tratamiento 0.5 mg L⁻¹ BAP fue el segundo con hojas más largas (3.35 cm), por lo que con fines de multiplicación el frasco sirve para contener seis brotes (figura 5.14 A', B, C, D, E y F).

5.2.7. Subcultivo SC5-1 de brotes de *C. hookeri*

Los brotes establecidos en este experimento fueron seleccionados en base al largo de hoja (2 cm) aprox. para todos los tratamientos (0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹), los brotes se clasificaron en base a las concentraciones de BAP (0.5 y 1.0 mg L⁻¹) del SC3 y se mantuvo esa clasificación en SC4, SC5-1 (cuadro 5.11.).

El contenedor fue frasco se colocó en el caso de tratamiento con concentraciones BAP un solo explante, para que los brotes adventicios se desarrollaran de acuerdo al patrón de generación de brotes, es decir en la base del brote original, y se tuviera mayor volumen para expandirse en forma horizontalmente y pudieran crecer mejor.

La mayor longitud de hoja del brote propágulo (4.53 cm) fue registrada en el tratamiento testigo, así también se registraron las bases de tallo más delgadas (0.26 cm), y con menor cantidad de brotes (0.23 por propágulo, figura 5.15), también permitió la generación de más raíces (0.57 raíces por propágulo), no muy largas (1.89 cm), (cuadro 5.11.); los resultados anteriores coinciden con lo reportado con Gil C. *et al.* (2019) donde los explantes sin BAP fueron los que tuvieron el mayor porcentaje de raíz. En el testigo el largo de hoja del explante es una característica que forma parte del vigor del brote madre, por lo que los explantes deben ser mayores a 2 cm, ya que menor a esta longitud en medio MS sin reguladores, afectó negativamente su vigor, que se reflejó en el ancho de la base de tallo y en la longitud de hoja.

En los tratamientos con BAP, la base más ancha se registró en 0.5 mg L⁻¹ (0.51 cm), así como la mayor cantidad de brotes (10.36 brotes por propágulo, figura 5.16), y en todos estos tratamientos con BAP, no se presentó generación de raíces. Coincide con lo reportado con Gil *et al.* (2019) en *Cattleya trianae* en donde bajas concentraciones de BAP (0.05 mg L⁻¹) generaron el mayor porcentaje de brotes. Así también los tratamientos

con BAP (0.05, 0.5 y 2 mg L⁻¹) aumentaron la respuesta de brotes y disminuyeron la formación de raíces.

En el frasco por el contrario a lo que se esperaba, la planta se mantuvo compacta y los brotes generados se quedaron sin cubrir el espacio del frasco (figura 5.15. A, B y D).

Cuadro 5. 11. SC5-1 respuesta de brotes de *C. hookeri* a mg L⁻¹ de BAP, con origen de brotes en SC4.

Tratamiento		LH [†] (cm)	ABT [¶] (cm)	NB [§]	NR [Ⓟ]	LR [Ⓜ]	PBR ^{††}	HH30 ^{¶¶}
BAP mg L ⁻¹	OB							
0.0	0.5	4.53 ^a	0.26 ^b	0.23 ^b	0.57 ^a	1.89 ^a	46.00 ^a	4.00 ^a
0.5	0.5	2.98 ^b	0.51 ^a	10.36 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
1.0	1.0	3.10 ^b	0.45 ^a	2.80 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
*		0.002	3.70x10 ⁻⁰⁷	1.823x10 ⁻¹¹	7.45x10 ⁻⁰⁷	1.81x10 ⁻⁰⁶	2.1x10 ⁻⁰⁷	0.3333

OB: origen de brotes, subcultivo cuatro con seguimiento a clasificación subcultivo tres; †LH: longitud de hoja más grande; ¶ABT: ancho base de tallo; §NB: número de brotes; ⓅNR: número de raíces adventicias principales; ⓂLR: longitud de raíz adventicia más larga; ††PRB: porcentaje de brotes enraizados; ¶¶PHH30: porcentaje de hiperhidratación al d 30; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey (*P* ≤ 0.05).

En la multiplicación se reportan concentraciones bajas de BAP para la producción de brotes por ejemplo en *B. recurvata*, Waly *et al.* (2018) reportaron en la etapa de multiplicación el uso de 0.4 mg L⁻¹ BAP para promover la iniciación de brotes en las puntas en el medio B5 comparado con los medios MS y WPM. También incremento el número de brotes (3.4 brotes/grupo) y el número de hojas (24) comparado con otros tratamientos, estos resultados contrastan con los obtenidos es este trabajo para *Calibanus*. Por otro lado, Ramírez-Gottfried *et al.* (2021) al comparar el medio MS vs vermicomposta, en la etapa de multiplicación, de *Dasyilirion cedrosanum* usaron 1 mg L⁻¹ BAP más 0.2 mg L⁻¹ AIA, y el tratamiento con el medio MS fue el que generó el mayor promedio de brotes (8.25 brotes/ explante) en contraste con el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BAP (2.8 brotes/explante) en *Calibanus*, pero inferior al tratamiento 0.5 mg L⁻¹ (10.36 brotes por propágulo).

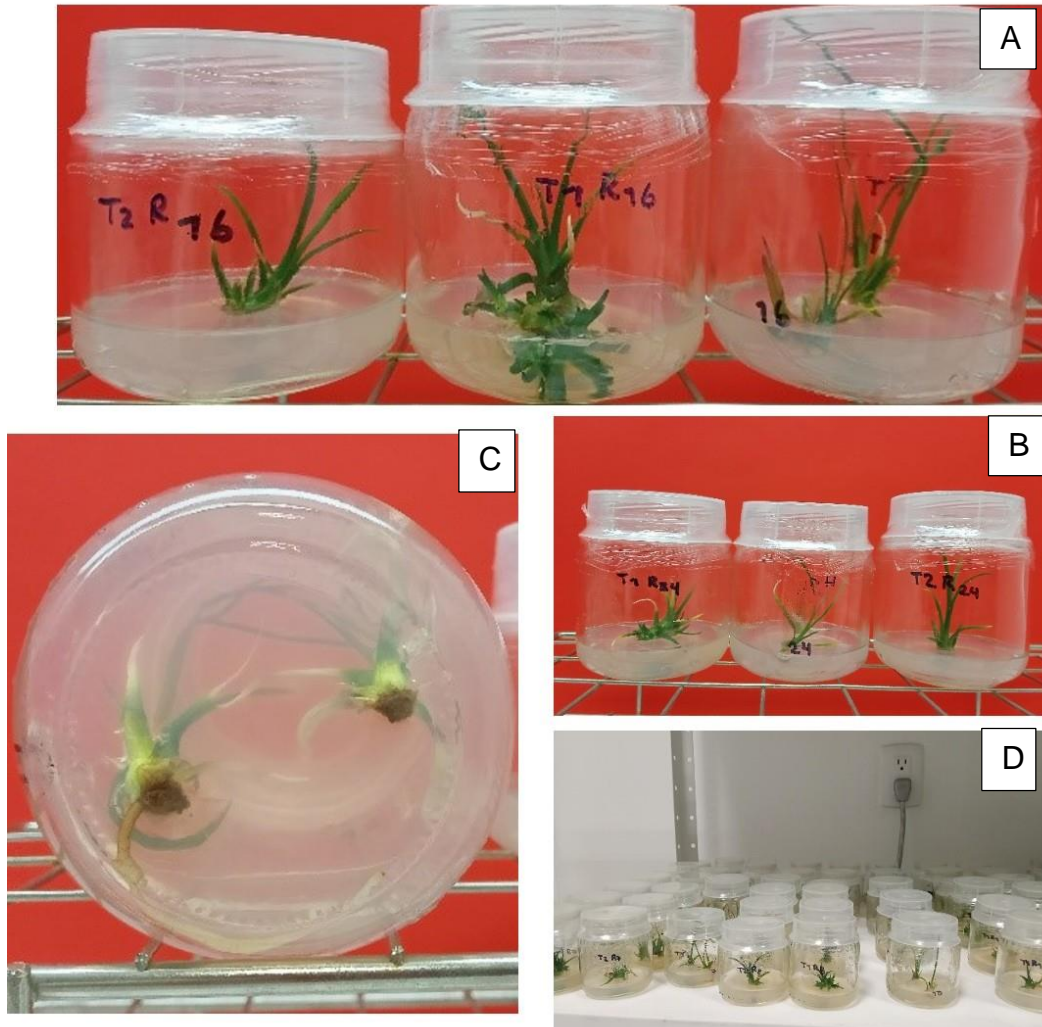


Figura 5. 15. Tratamientos del SC5-1, Aspecto al día 30 de subcultivo, los propágulo tuvieron de 2 cm aprox. de LH cuando se establecieron. A. tratamientos R16 de izquierda a derecha 1, 0.5 y 0 mg L⁻¹ BAP; B. tratamientos R24 de izquierda a derecha 0.5, 0, 1 mg L⁻¹, C. 0 mg L⁻¹ muestra un brote con raíz y otro no logró enraizar; D. vista general de experimento SC5-1.

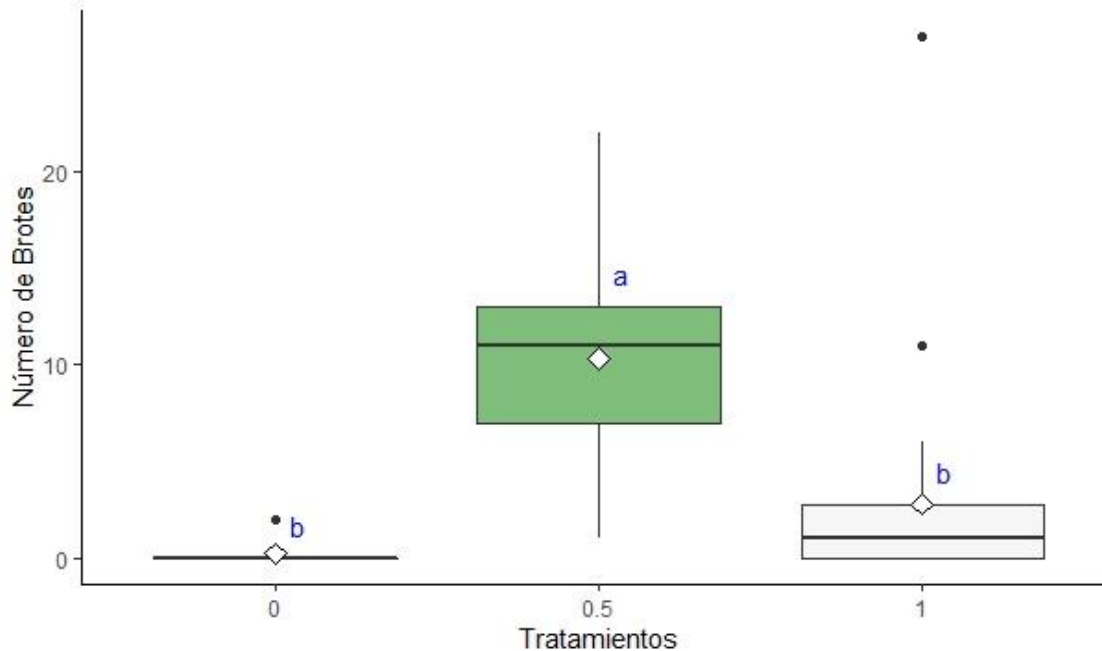


Figura 5. 16. Gráfica de cajas, respuesta de brotes a (mg L⁻¹) BAP, número de brotes de *C. hookeri* al día 30 SC5-1.

5.3. Enraizamiento y aclimatación de brotes madre (BM) *C. hookeri*

5.3.1. Enraizamiento *ex vitro* y aclimatación BM de *C. hookeri* SC2 en tubete

Los brotes que se enraizaron *ex vitro*, tuvieron una primera producción de brotes, se separaron al día 30 en condición aséptica, los brotes propágulo se regresaron al medio donde se encontraban y hasta el día 58 se realizó el proceso de enraizamiento *ex vitro* (figura 5.17 E y F). Las variables NR y LR no fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos, los brotes con el tratamiento sin Radix® 10000 (0 mg kg⁻¹) tuvieron la capacidad de generar raíces, superior en número (2.41 raíces) y en longitud (11.43 cm), así como el mayor porcentaje de supervivencia de brotes con formación de raíces, comparado con los demás tratamientos (cuadro 5.12 y figura 5.17. D).

Cuadro 5. 12. Respuesta a mg kg⁻¹ de Radix 10000[®] en enraizamiento *ex vitro* y aclimatación en tubete de brotes de *C. hookeri* SC2, después de su primera producción de brotes, 80 días después del trasplante.

Tratamientos mg kg ⁻¹	NR [†]	LR [¶]	PBR [§]
0	2.41 ^a	11.43a	73.3 ^a
1000	2.12 ^a	9.87a	33.3 ^a
2000	1.76 ^a	5.73a	46.7 ^a
4000	1.20 ^a	4.89a	40.0a
*	0.41	0.10	0.1272

†NR: número de raíces primarias; ¶LR: longitud de raíz adventicia más larga; §PSBR: porcentaje de supervivencia brotes con raíz; *: valor- *P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq <0.05$).

Nuestros resultados difieren en que usamos para este experimento brotes que ya habían tenido una primera producción de brotes, que pudieran tener un menor contenido de reservas y que además habían estado expuestos a una concentración de BAP por mayor tiempo, sin embargo a pesar de ello, los brotes sin Radix[®], fueron capaces de generar raíces y son similares a los resultados de Vadillo-Pro *et al.* (2016) quienes reportaron que los brotes que no desarrollaron raíces *in vitro* fueron tratados mediante inmersión en polvo comercial de enraizamiento (Radix[®]1500), obtuvieron un porcentaje de enraizamiento y una tasa de sobrevivencia del 75%.

La talla de plantas sobrevivientes enraizadas fue superior a las que no tuvieron raíces. Al respecto Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) determinaron en *Agave inaquidens* que el tamaño de planta y el medio de cultivo afectó el enraizamiento de las plantas. Las plantas de longitud de 4 cm con más de 2 raíces presentaron una sobrevivencia del 100%.



Figura 5. 17. Enraizamiento ex vitro y aclimatización de brotes de *C. hookeri* con concentraciones (mg.kg^{-1}) de Radix 10000 ® en tubete a 80 días del trasplante A. y B. charolas con tubetes del experimento. C. 1000 mg kg^{-1} R5; D. 2000 mg kg^{-1} R10; E. 0 mg kg^{-1} R6 F. 4000 mg kg^{-1} R12.

5.3.2. Enraizamiento *in vitro* AIB de brotes sanos de *C. hookeri* SC3

Los brotes empleados en este experimento fueron generados en concentraciones de 0.5 y 1 mg L^{-1} BAP del SC2, al separarlos del brote propágulo para enviarlos a enraizamiento con Radix, estos brotes generados por cada propágulo se mantuvieron juntos en el tubo de ensayo donde permanecieron 30 días en el mismo medio. Los brotes se establecieron al azar en concentraciones 0.1 , 0.25 y 0.5 mg L^{-1} AIB, para el testigo (0 mg L^{-1}) fueron brotes de 1 mg L^{-1} BAP. Previamente al registro de las variables de interés (NR, LR y PBR), se registraron a los 10 días de establecidos, la longitud de hoja y ancho de base de tallo, ambas fueron significativas ($P \leq 0.05$). Los brotes en enraizamiento con hojas más largas fueron las del tratamiento 0.1 mg L^{-1} (9.75 cm) y las bases de tallo más anchas se registraron en 0.25 mg L^{-1} de AIB.

Las variables NR y LR registradas al día 30, no fueron significativas ($P \leq 0.05$), los brotes con mayor número de raíces estuvieron en las concentraciones 0.5 y 0.25 mg L^{-1} AIB

(0.90 y 0.63 raíces), en cuanto a la mayor longitud de raíz, los mejores tratamientos fueron 0 y 0.5 mg L⁻¹ AIB (1.39 y 1.15 cm), (cuadro 5.13).

Cuadro 5. 13. Enraizamiento *in vitro* con AIB de brotes de *C. hookeri* durante 40 días, concentraciones 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP.

Tratamiento AIB mg L ⁻¹	LH10 [†]	ABT10 [¶]	NR [§]	LR ^b	PBR ^α
0	7.66b	0.56b	0.35 ^a	1.39a	35.0a
0.1	9.75a	0.70ab	0.38 ^a	0.41a	23.8 ^a
0.25	6.97b	0.76 ^a	0.63 ^a	0.77a	52.6 ^a
0.5	6.77b	0.61ab	0.90 ^a	1.15a	47.6 ^a
	0.0003 ^{**}	0.0036	0.1352	0.2507	0.222

†LH: longitud de hoja más grande a los 10 días en medio de enraizamiento; ¶ABT: ancho base de tallo a los 10 días en medio de enraizamiento; §NR: número de raíces primarias; bLR: longitud de raíz adventicia más larga; αPBR: porcentaje de brotes con raíz al día 40; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey (*P* ≤ 0.05).

Se ha documentado el efecto positivo del AIB en el enraizamiento. La formación de raíz *in vitro* en brotes individualizados se incrementó cuando al medio MS se le adicionó 1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico; sin embargo, en el tratamiento sin regulador de crecimiento también se observó la formación de raíces, aunque en menor proporción (Guillen *et al.*, 2015). El medio MS sin reguladores de crecimiento en brotes de *C. hookeri* formó las raíces más largas (1.39 cm, cuadro 5.13.). Este comportamiento pudiera estar relacionado con las reservas de los brotes ya que tuvieron desgaste al producir brotes y estar expuestos en su generación y desarrollo a concentraciones de BAP. En relación al NR y LR, hay coincidencia con Zhang *et al.* (2013), quienes usaron medio MS libre de reguladores en los brotes de *Agave hybrid*, regenerados mediante organogénesis, con un número promedio de 5.39 raíces por brote y longitud de 8.44 cm por raíz dentro de 30 días, lo que explica la capacidad de ciertas especies para enraizar sin reguladores de crecimiento. Así también coincide con lo reportado con Puente-Garza *et al.* (2015) en *Agave salmiana* ya que las plantas generadas en multiplicación se enraizaron en medio de aclimatación libre de reguladores de crecimiento por 30 días.

Factores como la sacarosa en medio de cultivo superiores a 30 g L⁻¹ favorecen el enraizamiento ya que, Olivera-Ortega *et al.* (2000) reportaron efectos positivos de la concentración de sacarosa, en la fase de enraizamiento *in vitro*, 40 g L⁻¹ en gerbera. Por

otra parte, hay un efecto negativo en el enraizamiento, cuando los brotes permanecen en concentraciones de citocininas, este efecto se incrementa a medida que las concentraciones son mayores. Al respecto Adelberg y Naylor-Adelberg (2012) reportaron, que las citocininas continuaron reduciendo el enraizamiento de 92 % (control) a 68 % con 3.2 μM (0.77 mg L^{-1}) meta topolina o 10 μM (2.2 mg L^{-1}) BA y 10 μM (2.4 mg L^{-1}) MT en sólo un 20% de las plantas enraizaron. Encontraron como alternativa usar medio líquido, en éste las plantas fueron más grandes y disminuyó el efecto negativo del enraizamiento, sin afectar la tasa de multiplicación, así la concentración 6 μM (1.35 mg L^{-1}) BA en medio líquido fue óptima para la multiplicación y enraizamiento de *Aloe barbadensis*. También, Gil *et al.* (2019) determinaron que el uso de BAP en concentraciones de 0.5 y 2 mg L^{-1} disminuyeron la formación de raíces en *Cattleya trianae*, con un 0.62% y 0.56% y la no utilización de BAP reportó el mayor enraizamiento, 7.35%.

La formación de raíces no tuvo buena respuesta, el porcentaje de brotes con raíz no fue significativa (cuadro 5.13.), a pesar de ello se observó el mayor porcentaje en el tratamiento 0.25 mg L^{-1} AIB (52.6 %, cuadro 5.13.) que es bajo. Este porcentaje bajo de enraizamiento puede explicarse por el factor especie y porcentaje de sales del medio base (MS), Reyes-Silva *et al.* (2013), reportaron que al evaluar enraizamiento a los 45-50 días en brotes generados en multiplicación con un medio base al 50% en especies *Beaucarnea goldmanni*, *B. recurvata* y *B. gracilis* se obtuvieron los porcentajes más bajos de enraizamiento (34, 23 y 14% respectivamente), no así en los géneros *Dasyllirion* y *Nolina* que alcanzaron de 75 a 100 % de enraizamiento. Como parte del manejo que tuvieron los brotes de *C. hookeri* probablemente tuvo efecto negativo ya que los brotes al separarlos del brote propágulo se dejaron en el mismo medio donde se generaron (30 días tiempo de generación y 30 días de desarrollo) con menos nutrientes, BAP y espacio entre los brotes generados por propágulo, éstos se quedaron en el tubo de ensayo donde fueron generados. No se evaluó el número de brotes que estos generaron, pero fue muy bajo. Así también en el transcurso de los 40 días de enraizamiento se apreció que las hojas externas de *C. hookeri* se secaron y estas pudieron ser un impedimento físico para la generación de raíces adventicias (figura 5.18. A y B).



Figura 5. 18. Enraizamiento *in vitro* de brotes que previamente generaron brotes, en un medio MS suplementado con AIB al día 40. A. R2, de izquierda a derecha (0.1, 0, 0.5 y 0.25 mg L⁻¹). B. R13, de izquierda a derecha (0.25, 0.5, 0.1 y 0 mg L⁻¹).

En plantas testigo establecidas *in vitro* de semilla que se dejaron en tubos de ensayo por nueve meses, al extraerlas del tubo de ensayo para aclimatarlas se observó que generaron raíces en las axilas de hojas superiores, éstas se enredaron alrededor del tallo por la parte superior, ya que no pudieron penetrar las hojas secas y tener contacto con el medio de cultivo. Por lo que una actividad intermedia pudiera ser que en el transcurso de los 40 días y una vez que las hojas externas tan pronto senescen se retiren, la herida absorbería el regulador o medio fresco con nutrientes, mejorando de esta manera el enraizamiento.

5.3.3. Inducción de raíz *in vitro* con AIB y aclimatización de brotes de *C. hookeri*

Los brotes que se establecieron en este experimento, tenían 40 días de edad (10 de generados y 30 días en producción de brotes). Los brotes fueron generados en SC3 (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg L⁻¹ BAP), fueron brotes sanos que mantuvieron la clasificación de la concentración donde fueron generados, subcultivados a 0.5 mg L⁻¹ BAP (SC4), tuvieron una primera producción de brotes. Los testigos tanto con captán, captán + potencior son los brotes generados en SC4 (de 10 días).

Los brotes que se aclimataron *ex vitro*, previamente se indujeron a enraizamiento en medio semisólido MS, suplementado con 0.5 y 1 mg L⁻¹ AIB y el testigo sin éste. Al realizar el trasplante se dio tratamiento con captán, captán + potencior, posteriormente se trasplantaron en tubetes. A los 60 d de establecidos en aclimatación, se evaluaron, para ello se retiraron las hojas secas y residuos de las bases de tallo de los brotes que no enraizaron, los brotes supervivientes con raíces fueron registrados.

Se realizó el análisis del experimento completamente al azar, con tres factores, origen de brote (OB), concentración de ácido indol-3-butírico (AIB) y fungicida (F), mediante modelo lineal generalizado mixto debido a que el número de repeticiones fue baja, de cinco. La variable dependiente supervivencia con raíz, fue una variable binomial sobrevive con raíz y no sobre vive sin raíz (también se incluyó a las que sobrevivieron pero que no tuvieron raíz). Las plantas que no tuvieron raíz al momento de la evaluación se veían con hojas externas deshidratadas, por lo que se consideró una respuesta de fracaso. Respuesta de éxito se consideró sólo plantas con raíz con crecimiento activo e hidratadas.

La comparación de medias para cada factor (OB, F y AIB) en sus niveles no fueron significativos ($p \leq 0.05$, cuadro 5.14). La supervivencia a 60 días después del trasplante de brotes a condiciones *ex vitro*, tuvo porcentajes bajos de supervivencia de brotes que formaron raíz, así, los niveles que tuvieron los porcentajes más altas fueron brotes trasplantados que se les aplicó 1 g L⁻¹ de captan por 5 min (0.47%), origen de brote 1 y 0.5 mg L⁻¹ BAP (10 y 6%) y los que estuvieron 48 h un medio de inducción suplementado con 1 mg L⁻¹ de AIB (0.3%), (cuadro 5.13.). Los porcentajes de supervivencia son muy

bajas comparadas con lo reportado por Reyes-Silva *et al.* (2013), quienes evaluaron enraizamiento de 45-50 días en brotes generados en multiplicación con un medio base al 50% en especies *Beaucarnea goldmanni*, *B. recurvata* y *B. gracilis*, fueron los porcentajes más bajos de enraizamiento en estas especies (34, 23 y 14% respectivamente).

Cuadro 5. 14. Supervivencia de brotes de *C. hookeri* con raíz al día 60 del trasplante, después de un proceso de inducción a enraizamiento *in vitro* con AIB.

Factor	Nivel	PSBR60	
F	C	0.47	A
	CP	0.06	A
	*	0.0771	
OB	1	10.00	A
	0.5	6.00	A
	2	3.00	A
	2.5	3.00	A
	1.5	0.00	A
	*	0.7851	
AIB	1	0.30	A
	0.5	0.10	A
	*	0.2334	

AIB: ácido indol-3-butírico 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹; C: captán 1 g L⁻¹; CP: captán 1 g L⁻¹+ potencior 10 mL L⁻¹; OB: origen de brotes que generaron 1ra. producción de brotes a 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ BAP; PBR60: porcentaje de brotes con raíz al día 60; *: valor-P. Analizado como Modelo Lineal generalizado mixto. comparación de medias ($P>0.05$)

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Guillen *et al.* (2015), en *B. inermis*, la formación de raíz *in vitro* en brotes individualizados se incrementó cuando al medio MS se adicionó 1 mg L⁻¹ de ácido indol-3 butírico. En cuanto a sólo considerar cómo éxito las plantas que formaron raíz se coincide con Padúa *et al.* (2014) quienes en palma de aceite (*Elaeis guineensis*) determinaron que las plántulas enraizadas son más aptas para la fase de aclimatación ya que obtuvieron una tasa del 85%, lo cual demostró la necesidad de formación de raíz.



Figura 5. 19. Tratamientos inducción *in vitro* de enraizamiento en medio semisólido durante 48 h, enraizamiento de brotes y aclimatación *ex vitro*, que presentaron raíces a los 60 días después del trasplante. A: TT2CP; B: T2R4; C: T6R2; D: T7R2; E: TTC10; F: T14R2; G: T17R3; H: TTC07.

Los tratamientos que formaron raíces al día 60 después de aplicar un proceso de inducción a enraizamiento *in vitro* fueron TTC, TTCP, T2, T6, T7, T14, T17 (figura 5.19. A, B, C, D, E, F G, H).

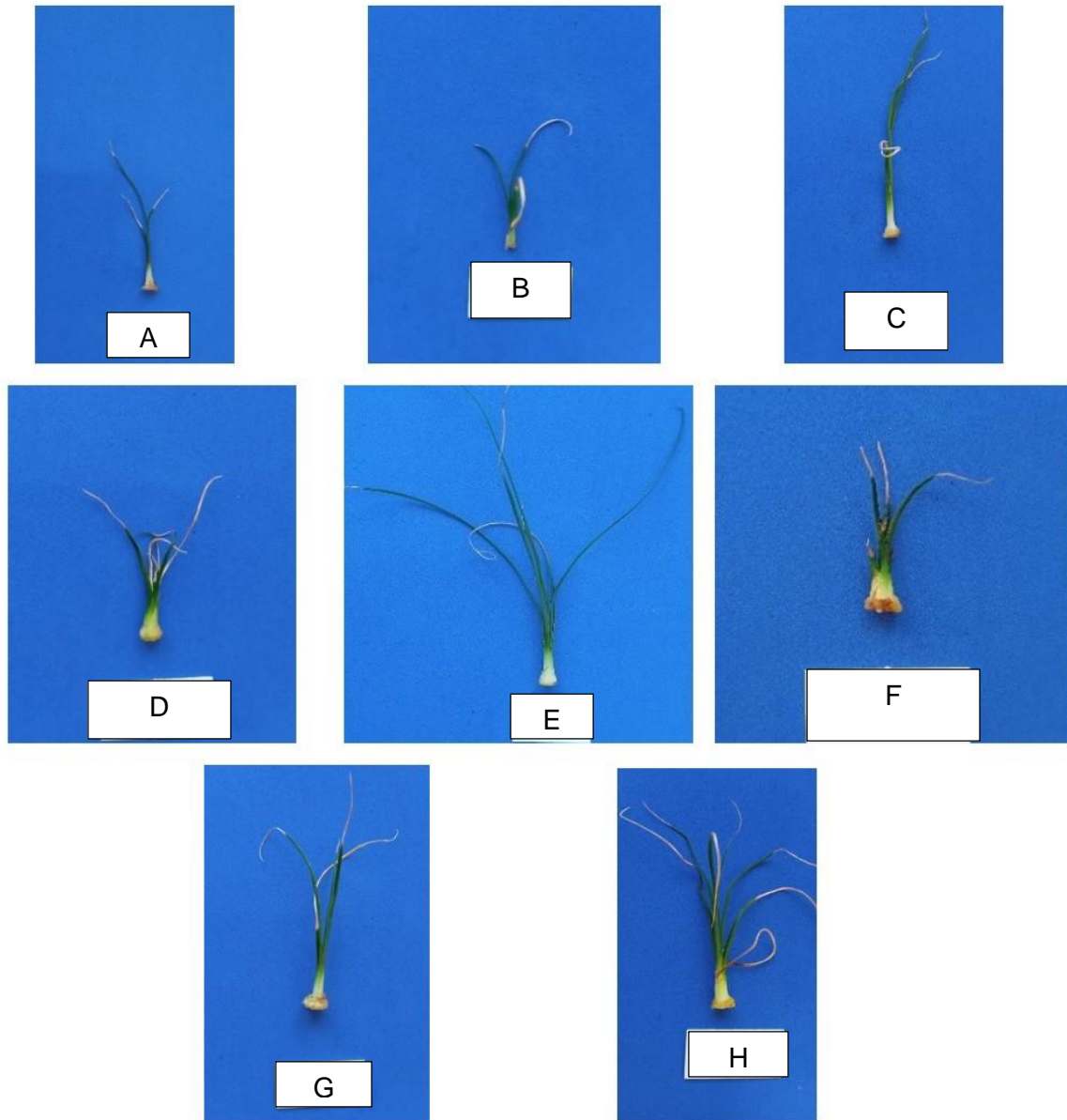


Figura 5. 20. Tratamientos inducción in vitro de enraizamiento y aclimatación de brotes que no formaron raíces a los 60 días después del trasplante. A: T1R1; B: T5R2; C: T9R3; D: T11R3; E: T12R2; F: T13R2; G: T8R1 Y H: T19R4.

Un factor que pudo haber influido en los bajos porcentajes de enraizamiento fue que los contenedores con los tubetes permanecieron en la sala de incubación a una intensidad lumínica de $80 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y que los brotes al haber tenido su primera producción de brotes permanecieron más tiempo expuestas a concentraciones de BAP lo que interfirió en la formación de raíz. Al respecto Adelberg y Naylor-Adelberg (2012) reportaron la

reducción del porcentaje de enraizamiento en *A. barbadensis*, 92% (testigo) y con 10 μM (2.2 mg L^{-1}) de BAP se tuvo el 68%. Así también Gil C. *et al.* (2019) en *Cattleya trianae* reportó menor porcentaje de enraizamiento cuando los brotes estuvieron expuestos a BAP, concentraciones de 0.5 y 2 mg L^{-1} tuvieron 0.62 y 0.56 % respectivamente. La no utilización de 6-BAP generó el 7.35% de enraizamiento.

5.4. Establecimiento *in vitro* semillas *C. hookeri* con BAP-ANA

El porcentaje de germinación fue una variable respuesta no significativa ($p \leq 0.05$), el intervalo fue de 89.17 a 100.00 % (cuadro 5.16).

El porcentaje de emergencia se afectó en todos los tratamientos, hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos. Los tratamientos con mayor porcentaje de plantas emergidas (88.9 y 86.1 %) fueron 2.5, 0.1 y 0 mg L^{-1} BAP + ANA (cuadro 5.15). En la siembra de semillas de *C. hookeri* en el último paso del protocolo de desinfestación con 4 N ácido sulfúrico, se vertió el ácido directamente a las semillas seguido del agua, se agitó y se mantuvieron durante 5 min, algunas tuvieron una coloración rosa probablemente son las que se dañaron, por lo que éstas semillas probablemente fueron afectadas en su emergencia en todos los tratamientos. Las semillas que no emergieron se eliminaron del análisis que se realizó con 22 repeticiones de un total de 37, para analizar las variables PHH40, LH, NB, NR, LR e HH a los 60 días.

Cuadro 5. 15. Porcentaje de semillas de *C. hookeri* germinadas, emergidas y plántulas hiperhidratadas

Tratamientos		PC10 [†]	PG30 ^{††}	PE40 [§]	PHH40 [¶]
BAP mg L^{-1}	ANA mg L^{-1}				
0	0	9.0 a	89.2 a	86.1 a	22.7 a
2.5	0.1	0.0 a	100.0 a	88.9 a	13.6 a
2.5	0.5	0.0 a	97.3 a	62.2 b	9.1 a
5	0.1	2.0 a	97.3 a	59.5 b	31.8 a
5	0.5	2.0 a	97.3 a	62.2 b	18.2 a
	*	0.9918	0.9918	0.0028	0.9054

†PC10: porcentaje de contaminación a los 10 días; ††PG30: porcentaje de germinación al día 30; §PE40: porcentaje de plántulas emergidas al día 40; ¶PHH40: porcentaje de plántulas hiperhidratadas al día 40; *: valor-*P*.

En cuanto a la hiperhidratación de las plantas emergidas al día 40 de establecidas *in vitro* no hubo significancia ($P \leq 0.05$) el intervalo fue de 9.1 a 31.8 % (cuadro 5.15). Los tratamientos 2.5,0.5 y 2.5,0.1 mg L⁻¹ BAP+ANA fueron los que tuvieron el porcentaje más bajo de hiperhidratación.

El número de raíces en semillas germinadas *in vitro* de *C. hookeri* fueron significativas ($P \leq 0.05$) a los 10 y 30 días, el largo de raíz fue significativa ($P \leq 0.05$) a 10, 20 y 30 días. El testigo (0 mg L⁻¹ BAP + ANA) fue el mejor para el mayor número y longitud de raíces (cuadro 5.16), el segundo mejor tratamiento fue 2.5,0.1 mg L⁻¹ BAP-ANA, tanto en número de raíces (1.05 cm) como en longitud de raíz (0.48 cm) ambas al día 30. El número y longitud de raíz se afectó en forma negativa cuando se incrementó la concentración tanto de BAP como de ANA, el peor tratamiento fue 5, 0.5 mg L⁻¹ BAP+ANA con la menor cantidad de raíces (0.95 raíces por semilla) y la menor longitud de raíz primaria (0.18 cm), (cuadro 5.16).

En plántulas germinadas *in vitro* de *C. hookeri*, la longitud de hoja fue significativa ($P < 0.05$) al día 30 y 60 del establecimiento. Los testigos (0 mg L⁻¹ BAP+ANA) tuvieron las hojas más largas al día 30 y 60 (4.64 y 9.17 cm), seguido de los tratamientos 2.5, 0.1 mg L⁻¹ BAP+ANA al día 30 (1.53 cm) y 5,0.5 mg L⁻¹ BAP+ANA al día 60 (4.73cm), (cuadro 5.17).

Al día 60 no hubo diferencia en longitud de hoja entre tratamientos que tuvieron regulador, todos tienen la capacidad de generar plantas grandes. Una vez germinadas las semillas se mantuvieron las plántulas en el mismo medio hasta que se separaron los brotes para su subcultivo.

La presencia de brotes se apreció a partir del día 40, siendo significativo ($p \leq 0.05$) el número de brotes hasta el día 50 y 60 ($P \leq 0.05$). El mejor tratamiento a los 50 días después del establecimiento *in vitro* de las semillas fue el tratamiento 2.5, 0.1 mg L⁻¹ BAP+ANA (2.45 brotes por plántula, cuadro 5.17) y a los 60 días el tratamiento 2.5, 0.5 mg L⁻¹ BAP+ANA (5.82 brotes por plántula, figura 5.17), no hubo significancia entre los tratamientos que tuvieron reguladores en cuanto al número de brotes, pero si hubo diferencia con respecto a las semillas que se germinaron sin reguladores (0 mg L⁻¹

BAP+ANA) ya que hubo producción de brotes adventicios casi nula (0.04 brotes por plántula, cuadro 5.17 y figura 5.21).

Cuadro 5. 16. Respuesta de semillas de *C. hookeri* establecidas in vitro a BAP+ANA en número y longitud de raíz

Tratamientos		NR10 [†]	NR20 ^{††}	NR30 [§]	LR10 ^b (cm)	LR20 [¶] (cm)	LR30 ^{††} (cm)
BAP mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹						
0.0	0.0	0.97a	0.93 ^a	1.27 ^a	0.83 ^a	3.36a	4.99 ^a
2.5	0.1	0.8ab	1.02 ^a	1.05ab	0.21b	0.32b	0.48b
2.5	0.5	0.82ab	0.92 ^a	0.97b	0.18b	0.17b	0.20b
5.0	0.1	0.87ab	0.97 ^a	0.97b	0.23b	0.23b	0.29b
5.0	0.5	0.72b	0.92 ^a	0.95b	0.16b	0.16b	0.18b
*		0.0257	0.2184	0.0002	2x10 ⁻¹⁶	2x10 ⁻¹⁶	2x10 ⁻¹⁶

†NR10: número de raíces primarias a los 10 días; ††NR20: número de raíces primarias a los 20 días; §NR30: número de raíces primarias a los 30 días; ^bLR10: longitud de raíz primaria más grande a los 10 días; [¶]LR20: longitud de raíz primaria más grande; ††LR30: longitud de raíz primaria más grande a los 30 días; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

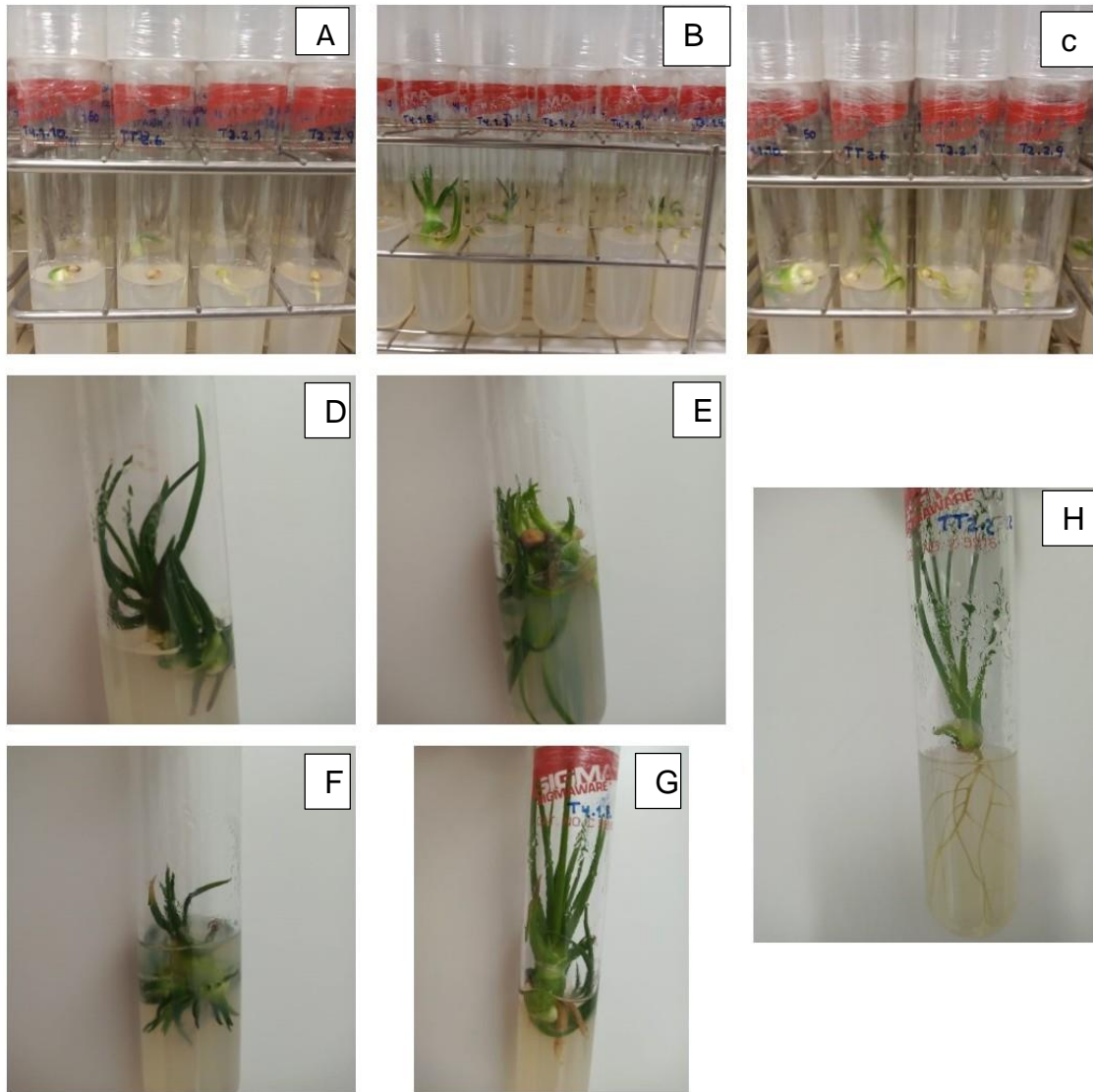


Figura 5. 21. Semillas, plántulas a 40 y 60 días después de establecidas in vitro en medio suplementado con BAP+ANA. A. Semillas 20 días después de establecidas de izquierda a derecha tratamientos 5,0,5; 0,0; 5,0,1; 2,5,0,5 mg L⁻¹; B y C. Variación en la emergencia 40 dde; B. tratamientos de izquierda a derecha 0,0; 5,0,5; 5,0,5; 2,5,0,5 mg L⁻¹; C. 5,0,5; 0,0; 5,0,1; 2,5,0,5 mg L⁻¹. Plántulas a 60 dde D.2,5,0,1; E.2,5,0,5; F.5,0,1 G.5,0,5; H.0,0 mg L⁻¹.

Los brotes se separaron para su subcultivo al día 90, es decir 50 días después de generados, todos los tratamientos mostraron tubos de ensayo con plantas hiperhidratadas, aunque el tratamiento con 5,0,1 mg L⁻¹ de BAP+ANA fue el que tuvo el mayor porcentaje de hiperhidratación (cuadro 5.15). El tratamiento sin reguladores no generó plántulas hiperhidratadas, al permanecer más tiempo en los tubos de ensayo, una señal de que el medio ya no era apto, fue que las primeras hojas se secaron, pero

el color verde permaneció, por lo que un medio sin reguladores conservó plantas por tiempos prolongados, aunque con la desventaja de que no generó brotes.

Cuadro 5. 17. Respuesta de plántulas de *C. hookeri* generadas de semillas establecidas *in vitro* en concentraciones BAP+ANA, a la longitud de hoja y número brotes.

Tratamientos		LH30 [†]	LH60 [¶]	NB40 [§]	NB50 ^b	NB60 ^a	PHH60 ^{††}
BAP mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹	(cm)	(cm)				
0.0	0.0	4.64 ^a	9.17a	0.0a	0.0a	0.00b	18.18a
2.5	0.1	1.53b	3.58b	1.18 ^a	2.45a	4.27ab	13.64a
2.5	0.5	0.86b	4.16b	0.40 ^a	1.59a	5.82 ^a	9.09a
5.0	0.1	0.40b	3.18b	0.86 ^a	2.27a	4.41ab	31.82a
5.0	0.5	0.84b	4.73b	0.36 ^a	2.41a	4.40ab	18.18a
*		2.2x10 ⁻¹²	1.8x10 ⁻⁰⁷	0.474	0.094	0.023	0.388

†LH30: longitud de hoja más grande a los 30 días; ¶LH60: número de brotes a los 40 días; §NB50: número de brotes a los 40 días; ¶NB60: número de brotes a los 60 días; ††PHH60; plántulas hiperhidratadas al día 60 *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

Zhang *et al.* (2013) reportarán que obtuvieron la organogénesis máxima de callo originado de explante de puntas de brote de *Agave hybrid* no. 11648 en medio Schenk and Hildebrandt (SH) complementado con 5.0 mg L⁻¹ BA en combinación con 0.1 mg L⁻¹ ANA y 0.1 mg L⁻¹ AIB, obtuvieron 98% de frecuencia de inducción de brotes.

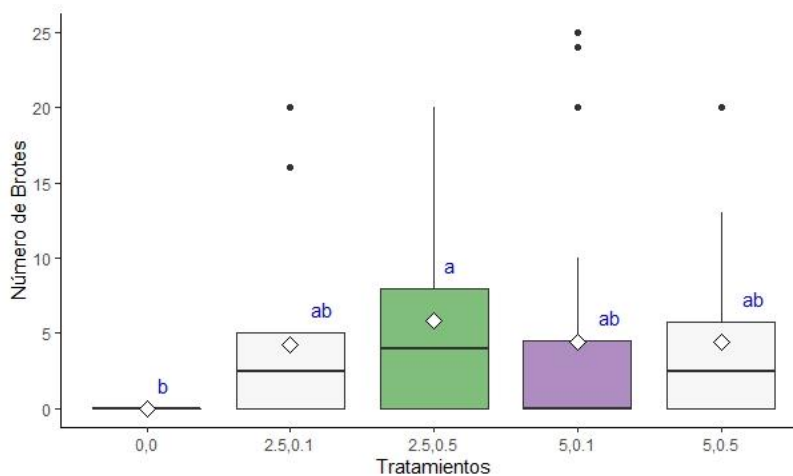


Figura 5. 22. Gráfica de cajas, número de brotes al día 60 de plántulas germinadas *in vitro* en concentraciones BAP+ANA.

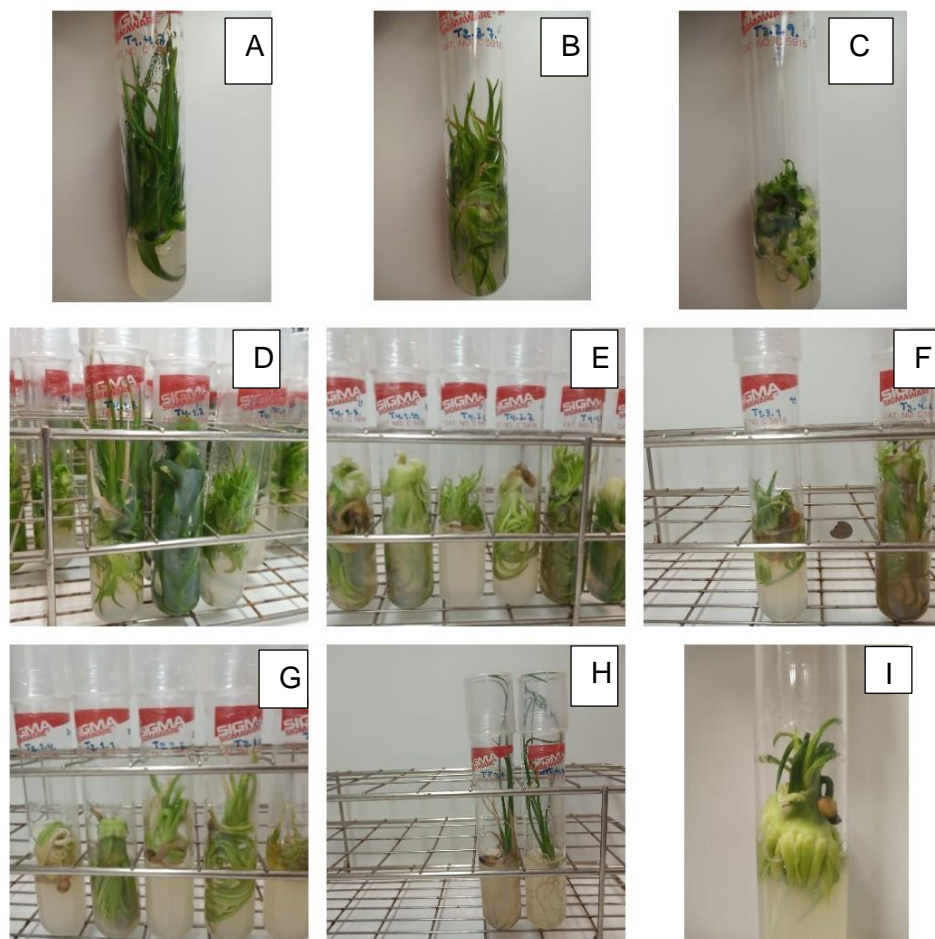


Figura 5. 23. Plántulas inducidas con BAP+ANA brotes generados de forma característica de acuerdo a la combinación 90 días después de establecidas. A. tratamiento 2.5,0.1; B. 2.5,0.5; C. 5,0.1 y D.5,0.5 mg L⁻¹. Plantas hiperhidratadas al día 90, después de semillas establecidas in vitro con BAP+ANA. E. tratamiento 5,0.5; F. 2.5,0.5 mg L⁻¹, G: izquierda 2.5, 0.1 mg L⁻¹ y derecha 5, 0.1 mg L⁻¹; H. 0 mg L⁻¹ (testigo); I. Tratamiento 2.5,0.1 mg L⁻¹, planta con color verde claro y patrón de formación de brotes en la base del tallo hacia abajo a 55 dde.

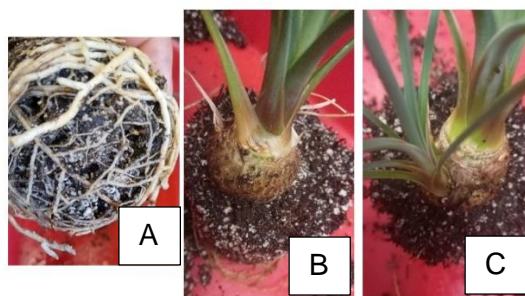


Figura 5. 24. A. raíces de plántulas generadas in vitro 6 meses después de trasplante y aclimatación. B. formación de caudex 6 m después de trasplante; C. planta con hijuelo desde aclimatación.

El número de brotes que reportaron Guillén *et al.* (2015) en *Beaucarnea inermis*, son menores (2.7 y 2.8 brotes por explante) a los obtenidos con concentraciones similares en *C. hookeri* (5.7 y 3.59 brotes por explante). Plántulas aclimatadas a seis meses de trasplante formaron caudex (figura 5.24) lo que coincide con lo reportado por Guillén *et al.* (2015) en *B. inermis*.

5.5. Subcultivos concentraciones BAP+ANA

5.5.1. Primer subcultivo brotes Calibanus BAP-ANA

En este experimento no hubo testigo debido a que las plántulas testigo no produjeron brotes. Una de las características de los brotes subcultivados con BAP+ANA fue que los brotes generados tuvieron una posición tendiente a vertical y de formación axilar en el tallo, por lo que el tubo de ensayo es apto como contenedor de brotes a los 30 días de subcultivo. Las variables longitud de hoja a los 20 y 30 días fueron significativas ($P \leq 0.05$). Los brotes con hojas más largas fueron los subcultivados a 2.5, 0.5 mg L⁻¹ al día 20 (2.78 cm) y 2.5, 0.1 mg L⁻¹ al día 30 (2.57 cm) son brotes con tallas bajas. El número de brotes fue significativo tanto al día 20 como al día 30 ($P \leq 0.05$) el mejor tratamiento fue 2.5, 0.1 mg L⁻¹ BAP+ANA (0.71 y 3.79 brotes por propágulo, cuadro 5.18 y figura 5.25) a pesar de no tener las mejores condiciones el tratamiento 2.5, 0.1 mg L⁻¹ BAP + ANA fue el mejor, las condiciones no adecuadas fue que no se hiciera el cambio a un nuevo medio a los 30 días de germinada, y el otro aspecto es que los brotes fueron visibles al día 40 después del establecimiento, dejarlos 30 días con la planta madre fue adecuado, pero al sobrepasar ese tiempo los brotes generados son afectados negativamente (figura 5.26. A, B, C y D). *C. hookeri* en el tratamiento testigo a pesar del tiempo no mostró hiperhidratación por lo que las concentraciones de BAP a 2.5 y 5 mg L⁻¹ tienen un efecto negativo al sobrepasar los 30 días el mantener la madre con sus brotes. Y esto lo podemos explicar de acuerdo a lo expuesto por Daguin y Letouzé (1986) la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa en los tejidos induce la vitrificación (hiperhidratación), cuando la estudiaron en condiciones *in vitro* tuvo mayor actividad en raíz y estuvo asociada a plantas de 42 días de edad en condiciones *in vitro* y a los niveles altos de NH₄⁺ (6.25 mM) y NO₃⁻¹ (25.04 mM) en un medio base MS.

Cuadro 5. 18. Respuesta a altas concentraciones de BAP + ANA de brotes de *C. hookeri* en su primer subcultivo, SC1 al día 30.

Tratamientos		LH20 [†]	NB20 [¶]	LH30 [§]	NB30 [‡]	PHH30 [Ⓜ]
mg L ⁻¹ BAP	mg L ⁻¹ ANA					
2.5	0.1	2.61 ^a	0.71 ^a	2.57 ^a	3.79 ^a	25.0 ^a
2.5	0.5	2.78 ^a	0.07 ^b	2.51 ^{ab}	0.71 ^b	20.6 ^a
5.0	0.1	1.67 ^b	0.058 ^b	1.86 ^b	0.77 ^b	41.2 ^b
5.0	0.5	1.99 ^b	0.11 ^b	2.05 ^{ab}	0.76 ^b	45.6 ^b
*		4.4x10 ⁻⁰⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	0.0115	2.2x10 ⁻¹⁶	0.0031

†LH20: longitud de hoja más grande a los 20 días; ¶NB20: número de brotes a los 20 días; §LH30: longitud de hoja más grande a los 30 días; ‡NB30: número de brotes a los 30 días; ⓂPHH30: porcentaje de hiperhidratación al día 30; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

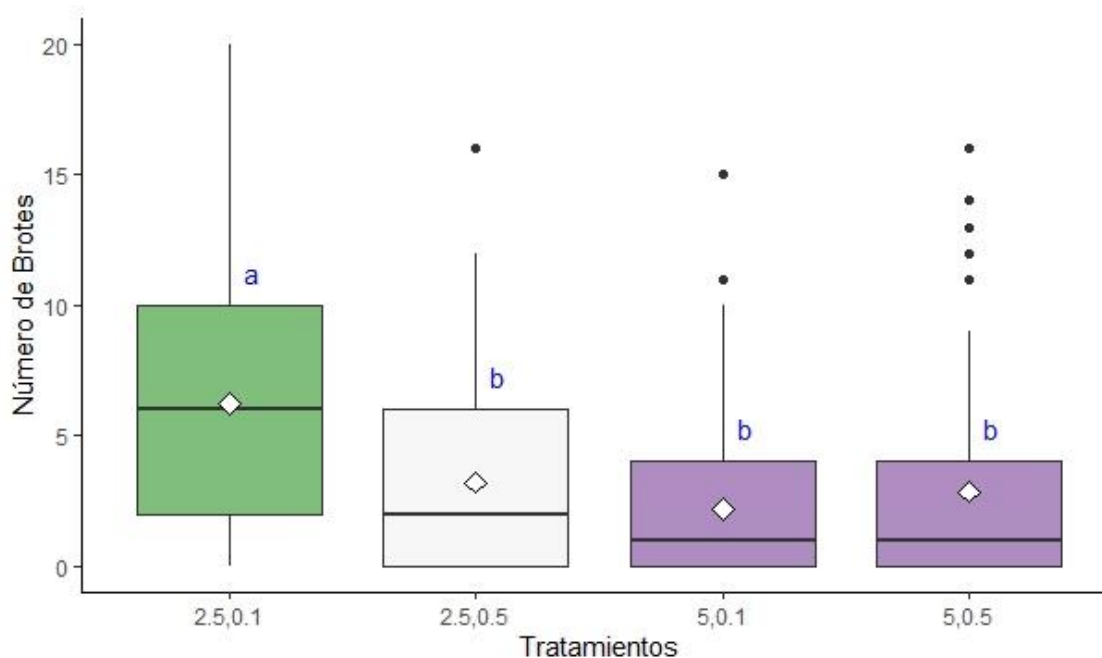


Figura 5. 25. Gráfica de cajas, número de brotes generados de *C. hookeri* al día 30 (SC1) en respuesta a diferentes concentraciones de BAP + ANA (mg L⁻¹).

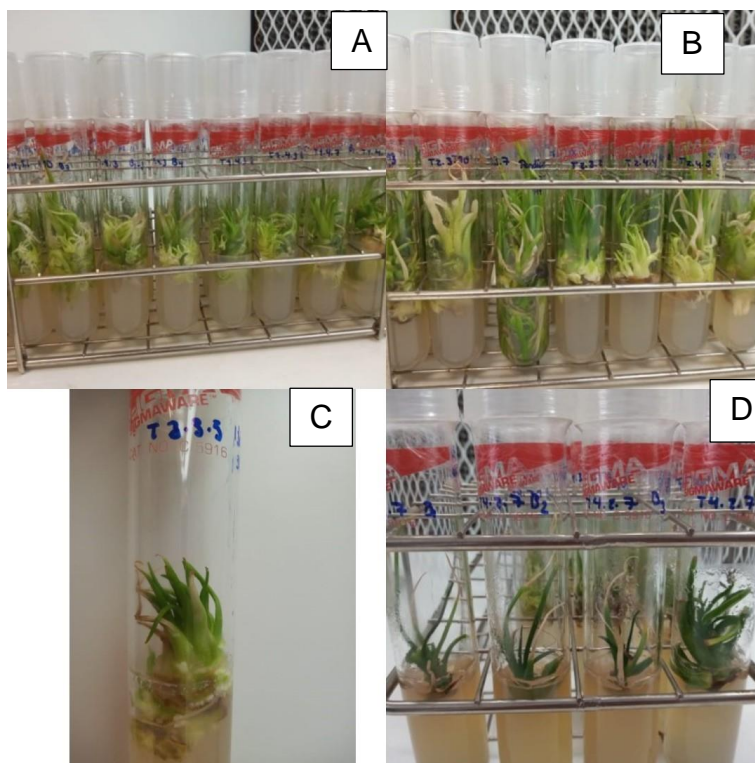


Figura 5. 26. Respuesta de brotes al SC1 30 día después de establecidos en BAP+ANA.
 A. tratamiento 2.5, 0.1; B. 2.5, 0.5; C.5, 0.1; D: 5, 0.5 mg L⁻¹.

5.5.2. Segundo subcultivo brotes de *C. hookeri* BAP + ANA

No se encontraron diferencias significativas entre las variables LH, NR, y LR ($p \leq 0.05$) y las variables NB, PBR y PHH30 (cuadro 5.19).

La LH en brotes subcultivados 30 días, fue mayor en 0.5 BAP en combinación con las concentraciones 0.02, 0.1 mg L⁻¹ ANA (6.53 y 6.23 cm), (cuadro 5.19 y figura 5.28).

El NB en las concentraciones 0.5, 0.1 y 1, 0.02 de BAP + ANA se observó el mayor número de brotes (5.18 y 4.95 brotes por propágulo), (cuadro 5.19 y figura 5.27).

La formación de raíz en brotes propágulo sólo se generó en las concentraciones tanto en 0.02 y 0.1 mg L⁻¹ ANA en combinación con 0.5 mg L⁻¹ BAP. La longitud de raíz (0.68 cm) más larga la tuvo el tratamiento 0.5,0.1 BAP + ANA. El porcentaje de los brotes que formaron raíces fue bajo (22.7 a 27 %) en las concentraciones 0.5, 0.1 y 0.5 0.02 mg L⁻¹ BAP+ANA. (cuadro 5.19).

Nuestro trabajo coincide con uso de concentraciones bajas de BAP+ANA en el cultivo de piña, Costa de Macêdo *et al.* (2003) reportaron que brotes *in vitro* mostraron altas tasas de multiplicación, las cuales fueron obtenidas en el tratamiento 1 + 0.5 mg L⁻¹ BAP + ANA, sin embargo los brotes más largos así como el mayor número de raíces fueron formados en los tratamientos 0.5 BAP+0.25 ANA y 0.25 BAP + 0.12 de ANA.

Cuadro 5. 19. Respuesta a bajas concentraciones de BAP-ANA, brotes generados del subcultivo de planta madre en bajas concentraciones, durante 30 días de SC2.

Tratamiento		LH [†]	NB [¶]	NR [§]	LR ^b	PBR ^ª	PHH30 ^{††}
mg L ⁻¹ BAP	mg L ⁻¹ ANA						
0.5	0.02	6.53 ^a	3.18a	0.23ab	0.32ab	0.227a	4.55a
0.5	0.10	6.23a	5.18 a	0.32a	0.68a	0.273a	18.18a
1.0	0.02	3.67b	4.95a	0.00b	0.00b	0.000a	0.00a
1.0	0.10	3.87b	3.18a	0.00b	0.00b	0.000a	27.27a
*		0.00002	0.3779	0.005	0.0008	7E-05	0.0092

†LH: longitud de hoja más grande; ¶NB: número de brotes; §NR: número de raíces; bLR: longitud de raíz más larga; ªPBR: porcentaje de brotes con raíz; ††PHH30: porcentaje de propágulos hiperhidratados al día 30; *: valor-*P*; medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

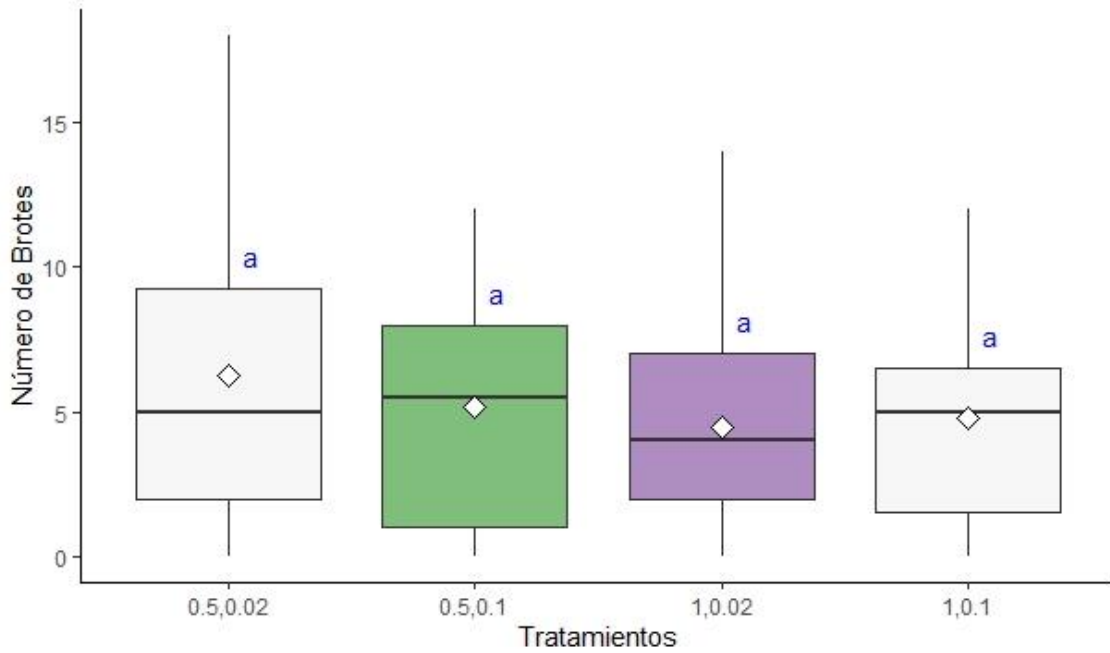


Figura 5. 27. Gráfica de cajas, número de brotes generados de brotes de *C. hookeri* al día 30 (SC1) en respuesta concentraciones de BAP + ANA (mg L^{-1}).

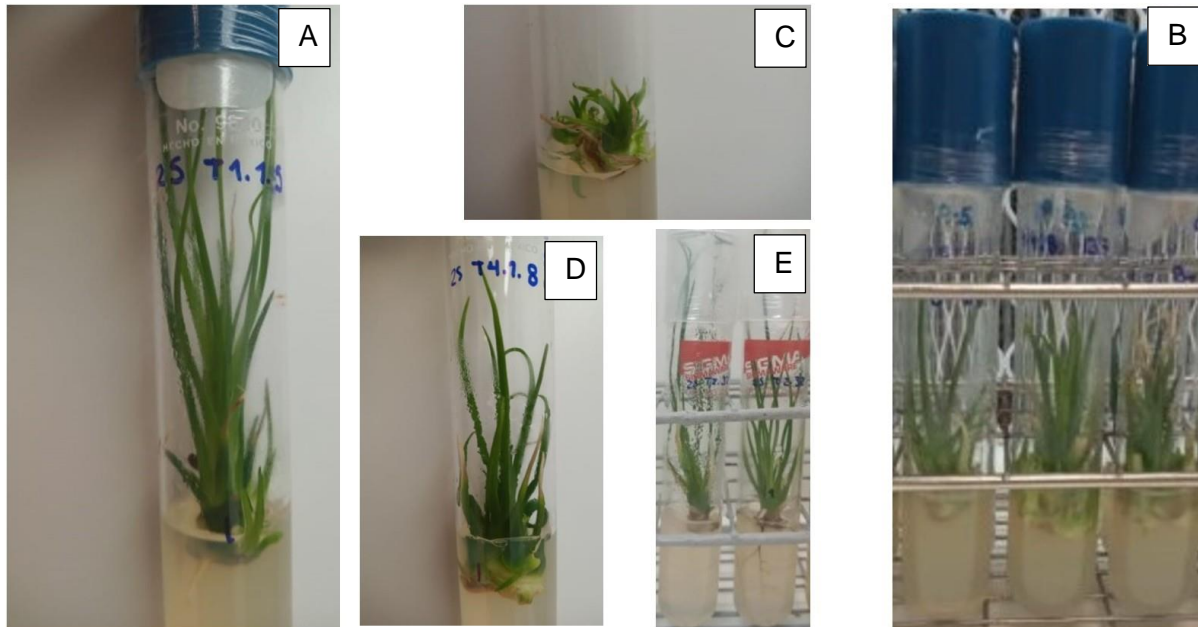


Figura 5. 28. Propágulos sanos con brotes a 30 días de SC2, de izquierda a derecha Tratamientos A. 0.5,0.02; B. 0.5,0.1; C. 1,0.02; D. 1,0.1; E. 0 mg L^{-1} BAP+ANA.

VI. CONCLUSIONES

Las concentraciones de 2.5 y 5 mg L⁻¹ de BAP promovieron la inducción de brotes hiperhidratados afectando la calidad de los brotes.

Las concentraciones menores a 1.5 mg L⁻¹ BAP disminuyeron la hiperhidratación en los brotes e incrementaron el número de brotes (6.35 brotes por propágulo).

La concentración de 0.5 mg L⁻¹ de BAP permitió recuperar brotes con hiperhidratación inicial, disminuyendo la aparición del desorden fisiológico en un 18.2 % y generó 6.19 brotes por propágulo.

Cuando se subcultivaron brotes sanos en la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de BAP se obtuvo mayor número de brotes entre 9.7-10.3 brotes por propágulo, a los 30 días del inicio del subcultivo, también se observó menor porcentaje de hiperhidratación (14%).

La especie *Calibanus hookeri* presenta una capacidad de enraizamiento relacionada con el vigor del explante y tiene facilidad para el enraizamiento *ex vitro*.

Se requieren concentraciones bajas de AIB para generar enraizamiento *in vitro*.

La inducción de enraizamiento *in vitro* de 48 h con AIB no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

El establecimiento *in vitro* de semillas y germinadas en medio con concentraciones de 5 y 2.5 mg L⁻¹ combinadas con 0.1 y 0.5 mg L⁻¹ de ANA generaron plantas hiperhidratadas.

VII. LITERATURA CITADA

- Adelberg, J. and Naylor-Adelberg, J. (2012). Effect of cytokinin on multiplication and rooting of *Aloe barbadensis* during micropropagation on agar and liquid medium. *Journal of Medicinally Active Plants*. 1:1-5. DOI: <https://doi.org/10.7275/R5251G4V>.
- Al-Saif, A. M., Sharit Hossain, A. B. M. and Mat Taha, R. (2011). Effects of benzylaminopurine and naphthalene acetic acid proliferation and shoot growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5291-5295. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/94292>
- Arimura, C. T., Finger, F. L. & Casali, V. W. D. (2000). Effect of ANA and BAP on ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) sprouting in solid and liquid medium. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2(2), 23-26. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000313048>
- Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J. y Peña Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del 'maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch.) una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(3), 263-269. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006
- Bureau International des Poids et Measures (BIPM). (2019). *The International System of Units (SI)*. <https://www.bipm.org/documents/20126/41483022/SI-Brochure-9-EN.pdf>
- Castillo-Quiroz, D., Antonio-Bautista, A., Ávila-Flores, D. Y., Sáenz-Reyes, J. T. y Castillo-Reyes, F. (2018). Tratamientos químicos y biológicos para estimular la germinación de semillas de *Nolina cespitifera* Trel. *Polibotánica*, 45, 147-156. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.11>
- Castañeda Nava J. J y Santacruz Ruvalcaba F. (2008). Propagación masiva *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (Nolinaceae)). Avances en la investigación científica en el CUCBA. [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Agronomia/ProduccionAgricola\(pp%201-86\)/CastanedaNava%20Jos%20Juvencio/19-24.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Agronomia/ProduccionAgricola(pp%201-86)/CastanedaNava%20Jos%20Juvencio/19-24.pdf)
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2022). *Jardines botánicos de México*. Jardín botánico El Charco Ingenio. <https://dgcii.conabio.gob.mx/jardines-botanicos/index.php?r=site/page&view=fichas-ib&IdJardinBotanico=8>
- Costa de Macêdo, C. E., Gomes Da Silva, M., Silva Da Nóbrega, F., Pimentel Martins, C., Vianna Barroso, P. A. & Ibrahim Alloufa, M. A. (2003). Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropónico das plântulas obtidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(3), 501-504. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000300035>
- Daguin, F. and Letouzé, R. (1986). Ammonium-induced vitrification in culture tissues. *Physiol. Plant.*, 66, 94-98. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01239.x>
- De-Nova, J. A., Castillo-Lara, P., Gudiño-Cano, A. K. y García-Pérez, J. (2018). Flora endémica del estado de San Luis Potosí y regiones adyacentes en México. *Árido-Ciencia*, 3,21-41.

<https://www.researchgate.net/publication/326260668> Flora endemica del estado de San Luis Potosi y Regiones Adyacentes en Mexico

- Diario Oficial de la Federación (DOF). (13/08/2018). Proyecto de Modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada el 30 de diciembre de 2010. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5534594&fecha=13/08/2018#gsc.tab=0
- Franco-Martínez, I.S. (1995). Conservación in situ y ex situ de las agaváceas y nolináceas mexicanas. *Boletín de la sociedad botánica de México*, 57, 27-36. <https://www.researchgate.net/publication/330341993> Conservacion in situ y ex situ de las agavaceas y nolinaceas mexicanas/fulltext/5c39e9c2a6fdccd6b5a73ff6/Conservacion-in-situ-y-ex-situ-de-las-agavaceas-y-nolinaceas-mexicanas.pdf
- García-Mendoza, A. y Galván Villanueva, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 7-24. <https://www.researchgate.net/publication/330340640> Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en Mexico
- García-Pineda, M. (2019). Conservación de plantas suculentas del jardín botánico Iztalaca, UNAM. En F. López-Valdez y J. G. Martínez Ávalos. (Eds.) Avances internacionales en cactáceas y suculentas. Manejo y conservación ante el cambio global. (pp. 53-57). Sinvestav. <https://www.researchgate.net/publication/336777624> Avances Internacionales de Cactaceas y Suculentas Manejo y Conservacion ante el Cambio Global
- Golubov, J., Mandujano, M. C., Arizaga, S., Martínez- Palacios, A. y Koleff, P. (2007). Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México*, 133-152. https://www.researchgate.net/profile/Jordan_Golubov/publication/255668440 Inventarios y conservacion de Agavaceae y Nolinaceae/links/544235730cf2a76a3cc8b5e5.pdf
- Guillen, S., Martínez-Palacios, A., Martínez, H. y Martínez-Avalos, J. G. (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae) una especie amenazada del noreste de México, *Botanical Science*, 93(2), 221-230. <https://botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/129/pdf/126>
- Fontes Araujo, R., Lopes Siqueira, D. y Cecon, P. R. (2008). Multiplificação *in vitro* do abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenácetico (ANA). *Revista Ceres*, 55(5), 456-460. <https://www.redalyc.org/pdf/3052/305226814019.pdf>
- Harmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr., F. T. D., Geneve, R. L. (2014). Principles of Tissue Culture and micropagation. En Harmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr., F. T. D., Geneve, R. L. (Eds.), Harmann & Kester's Plant Propagation Principles and Practices. 8th ed., pp. 1-922. Pearson.
- Hernández-Sandoval, L. (2019). Catálogo nomenclatural de la familia Nolinaceae Nakai en México. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Bases de datos SNIB-CONABIO proyecto KT011.1-5. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/KT011> Apendice Listado Taxonomico.pdf

- Flores, A., Romero-Sánchez, M. E., Pérez-Miranda y Pineda-Ojeda, T. (2019). *Nolina parviflora*, desinfección de semillas y su implicación en la conservación. *Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México*, 5(6),109-121. https://www.researchgate.net/publication/338111207_Nolina_parviflora_desinfeccion_de_semilla_y_su_implicacion_en_la_conservacion
- Flores García, A., Álvarez Moctezuma, J.G., Rodríguez de la O, J. L., Corona Ambriz, A. (2009). Respuestas organogénicas *in vitro* de *Nolina Parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 11(1), 25-32. <https://www.redalyc.org/pdf/497/49711999005.pdf>
- García-Mendoza, A. y Galván, V. R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 7-24. <http://doi.org/10.17129/botsci.1461>
- Hernández-Sandoval, L. (2020). *Flora del bajo y de las regiones adyacentes*. Familia Nollinaceae. Instituto de Ecología, A. C. https://www.researchgate.net/publication/340247199_NOLINACEAE_FLORA_DEL_BAJIO_Y_DE_REGIONES_ADYACENTES
- IREKANI, Instituto de Biología-UNAM. (26 de septiembre de 2016). "Colección anexa de frutos y semillas(MEXU)" Calibanus hookeri. <http://unibio.unam.mx/irekani/bitstream/123456789/69689/1/Calibanus-hookeri-FS4795-sem.jpg>
- Jhonson Margaret A. T. and Gale Rowena, M. O. (1983). "observation on the leaf-anatomy, pollen, cytology and propagation of *Calibanus hookeri* (Lem.) Trelease". *Brandleya*, 1, 25-32. <https://doi.org/10.25223/brad.n1.1983.a4>
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M. & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogénesis of *Agave victorae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 135-142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Majada, J. P., Centeno Ma. L., Feito, I., Fernández, B. & Sánchez-Tames. (1998). Stomatal and cuticular traits on Carnation tissue culture under different ventilation conditions. *Plant Growth Regulation*. 25, 113-121. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000009706.70078.1c>
- Millán-Soto, G., Robert, M. L., Tiznado-Hernández, M. E., Gutierrez, A. y Esqueda, M. (2019). Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. *Agrociencia*, 53(4), 549-561. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1827>
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Núñez Coronado, C., González Rosas, H. y Fernández Pavía, Y. L. (2021). Micropropagación de *Calibanus hookeri* (lem.) trel. (1911). Una especie amenazada. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23, 46-54. <http://doi.org/10.15446/rev.colom.biotc.v23n1.80873>
- Osorio-Rosales, M.L. y Mata-Rosas, M. (2005). Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *Hortscience*, 40, 1481-1484.

<https://www.researchgate.net/publication/268431289> Micropropagation of Endemic and Endangered Mexican Species of Ponytail Palms

- Padúa Souza, S. M., Viela Paiva, L., Texeira da Silva, L. G., Coutinho Silva, L. & Stein, V. C. (2014). *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). *Revista Árvore*, viçosa-MG, 38(6), 1095-1102. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000600014>
- Perales Aguilar, L., Santos Díaz, Ma. S., Gómez Aguirre, Y. A., Ramos Gómez, M. S. y Pérez Molphe Balch, E. (2020). Análisis *in vitro* de la acumulación de metales pesados en plantas de la familia *Asparagaceae* tolerantes a la baja disponibilidad de agua. *Nova Scientia*, 12,1-25. <http://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2081>
- Puente-Garza, C. A., Gutierrez-Mora, A. and García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. *Frontier in Plant Science*. 6:1-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655248/>
- Ramírez-Gottfried, R. I., Puente-Valenzuela, C. O., Chávez-Simental, J. A., Espinosa-Palomeque, B., García-Carrillo, M., Guillén-Enríquez, R. R. y González-Cervantes, G. (2021). Extracto de vermicompost como medio basal en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* *Dasyllirion cedrosanum*. *Terra Latinoamericana*, 39,1-11. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792021000100149
- Reyes-Silva, A. I., Morales-Muñoz, C. F., Pérez-Reyes, M. E. y Pérez-Molphe Balch, E. (2013). Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia de la Universidad de Aguas Calientes*, 58, 2-20. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67428815002.pdf>
- Rojas-Piña, V., Olson, M. E., Alvarado-Cárdenas, L. O. y Eguiarte, L. E. (2014). Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina* and submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. *Taxon*, 63(6), 1193-1211. <https://www.researchgate.net/publication/269998108> [Molecular phylogenetics and morphology of Beaucarnea Ruscaceae as distinct from Nolina and the submersion of Calibanus into Beaucarnea/link/56c7841508ae5488f0d2d866/download](https://www.researchgate.net/publication/269998108)
- Rodríguez Trejo, D. A., García Pascual, E., Quiahua Barrera, L., Reyes Valdóminos, E. Y. (2019). Germinación de semillas de *Dasyllirion lucidum* Rose y *Beaucarnea gracilis* Lemaire de matorral xerófilo. *Entreciencias*, 7(20), 1-12. <http://www.scielo.org.mx/pdf/edsc/v7n20/2007-8064-edsc-7-20-1.pdf>
- Rosa, Y. B. C. J., Espírito Santo, O. R., Carvalho Guimarães, R., Canazza de Macedo, M., Bento Tatara, M. y Rosa Junior, E. J. (2014). Efeito do substrato, do pericarpo e de tratamentos pré-germinativos na emergência de plântulas de pata-de-elefante (*Beaucarnea recurvata* Lem.) *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 20(1), 13-20. <https://doi.org/10.14295/rbho.v20i1.414>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación (30 de diciembre de 2010). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010#gsc.tab=0
- Vadillo-Pro, Ma. C., Hernández-Sandoval, L. and Malda-Barrera, G. (2016). *In vitro* regeneration from longitudinal sections of seedling of *Beaucarnea purpusi* Rose, an endemic and

endangered species. HortScience, 51,279-284.
<https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/51/3/article-p279.xml>

Vargas-Castillo, M. P. y Abdelnour-Esquivel, A. (2010). Cultivo *In vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. Dc) a partir de embriones cigóticos. *Agronomia Mesoamericana*, 21(1), 73-83.
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v21n1/a08v21n1.pdf>

Zhang, Y.- M., Li, X., Chen, Z., Li, J.-F., Lu, J.-Y. and Zhou, W.-Z. (2013). Shoot organogénesis and plant regeneration in agave hybrid, No.11648. *Scientia Horticulturae*, 161,30-34.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423813003464>

Ziv, M., Schwartz, A. y Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening. *Plant Science*. 52, 127-134. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90114-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90114-2)

Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plant . In: Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. (eds) Micropropagation. Springer Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_4