



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

## MORFOLOGÍA, GERMINACIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE *Calibanus hookerii* PARA SU CONSERVACIÓN

CESAR NUÑEZ CORONADO

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe CESAR NUÑEZ CORONADO, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor HÉCTOR GONZÁLEZ ROSAS, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

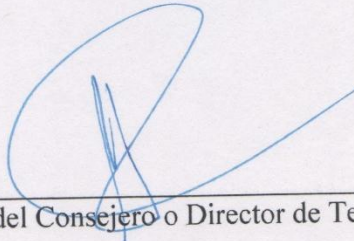
MORFOLOGÍA, GERMINACIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE Calibanus hookerii PARA SU CONSERVACIÓN.

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 27 de JULIO de 2017



Firma del  
Alumno (a)




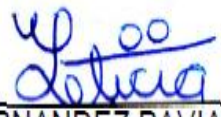
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis


La presente tesis titulada: Morfología, germinación y micropropagación de *Calibanus hookerii* para su conservación, realizada por el alumno: Cesar Núñez Coronado, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO \_\_\_\_\_   
HECTOR GONZALEZ ROSAS

ASESOR \_\_\_\_\_   
YOLANDA LETICIA FERNANDEZ PAVIA

ASESOR \_\_\_\_\_   
ADRIAN HERNANDEZ LIVERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2017

# MORFOLOGÍA, GERMINACIÓN Y MICROPROPAGACIÓN DE *Calibanus hookerii* PARA SU CONSERVACIÓN

Cesar Nuñez Coronado, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2017

## RESUMEN

*Calibanus hookerii* perteneciente a la familia de *Nolinaceae*, especie que está en la NOM-059-SEMARNAT-2010, catalogada como especie en peligro de extinción. Sus poblaciones naturales han disminuido debido a la sobreexplotación y destrucción de su hábitat, por lo que es importante desarrollar sistemas rápidos y eficientes para la propagación masiva de estas especies como una herramienta importante para su conservación y explotación racional. Mediante el uso del programa estadístico (SAS) y de procesamiento de imágenes (GIMP e IMAGEJ), se midieron las dimensiones de la semilla (largo, ancho, área, perímetro), en este trabajo se encontró un promedio de 3.99 mm de largo, 3.44 mm de ancho, 10.94 cm<sup>2</sup> área y 12.55 cm de perímetro, el fruto es una cápsula y presenta una sola semilla aunque pueden contener dos semillas en un mismo fruto. La calidad física de la semilla se determinó mediante el contenido de humedad el cual fue 6%, peso volumétrico 29.4 Kg hL<sup>-1</sup> y el peso de mil semillas 35 g. Para calidad fisiológica se realizaron pruebas de laboratorio, en una prueba de germinación se evaluó el porcentaje de plántulas normales, anormales y sin germinar; una prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad. La germinación con testa fue 40% y sin testa de 30%. *C. hookerii*, presenta tasas de germinación bajas en comparación con la germinación *in vitro* que fue de 97% la más alta. A partir de los 22 días se consideró que la plántula podría sobrevivir por si sola pues ya que presentaba sus estructuras funcionales bien desarrolladas, ya no era dependiente de las reservas de la semilla. En prueba con trifenil tetrazolio se midió viabilidad, el color rojo intenso en los embriones se consideró como viable, el color blanco no viable, mientras que en el color rosa se ubicaron a los embriones que van perdiendo su viabilidad, se obtuvo el 86% de viabilidad, con un largo del embrión de 3.24 a 2.42 mm y ancho 0.592 a 0.403 mm, siendo el tamaño del embrión de menos de  $\frac{1}{4}$  con respecto al tamaño de la semilla.

El protocolo para multiplicación masiva se logró mediante germinación de semilla sin testa en medio MS suplementado con 2.5, 5.0 y 7.0 mg.L de benciladenina (BA), Tidhiazuron (TDZ), cinetina (K) y 2-isopentil-adenina (2ip). El tratamiento más eficiente fue de 5 mg.L de BA, produciéndose un promedio de 18 plántulas por semilla, el peor tratamiento fue 2ip donde sólo un esayo de los realizados móstro resultados (7 mg.L).

**Palabras clave:** Citocininas, *Calibanus hookerii*, *nolinaceae*, ornamental.

## **MORPHOLOGY, GERMINATION AND MICROPROPAGATION OF *Calibanus hookerii* FOR CONSERVATION**

**Cesar Nuñez Coronado, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2017**

### **ABSTRACT**

*Calibanus hookerii* belonging to the family of *Nolinaceae*, species that is in NOM-059-SEMARNAT-2010, cataloged as an endangered species. Their natural populations have declined due to the over exploitation and destruction of their habitat, so it is important to develop fast and efficient systems for the massive propagation of these species as an important tool for their conservation and rational exploitation. Seed size (length, width, area, perimeter) was measured using a statistical program (SAS) and image processing (GIMP and IMAGEJ). In this study an average of 3.99 mm in length was found, 3.44 mm wide, 10.94 cm<sup>2</sup> area and 12.55 cm perimeter, the fruit is a capsule and presents a single seed although they may contain two seeds in the same fruit. The physical quality of the seed was determined by the moisture content which was 6%, volumetric weight 29.4 kg hL<sup>-1</sup> and the weight of one thousand seeds 35 g. For physiological quality, laboratory tests were performed, in a germination test the percentage of normal, abnormal and non-germinating seedlings was evaluated; a tetrazolium test to determine viability. Germination with forehead was 40% and without forehead of 30%. *C.hookerii*, has low germination rates compared to in vitro germination, which was 97% the highest. From the 22 days it was considered that the seedling could survive on its own because, since it had well developed functional structures, they were no longer dependent on the seed reserves. In test with triphenyl tetrazolium viability was measured, the intense red color in the embryos was considered as viable, the white color was not viable, while in the pink the embryos were located that are losing their viability, 86% of viability, with an embryo length of 3.24 to 2.42 mm and width 0.592 to 0.403 mm, the embryo size being less than ¼ with respect to the size of the seed. The protocol for massive multiplication was achieved by seed germination without test in MS medium supplemented with 2.5, 5.0 and 7.0 mg.L of benzyladenine (BA), Tidhiazuron (TDZ), kinetin (K) and 2-isopentyl-adenine (2ip) . The most efficient treatment was 5 mg.L of BA producing an average

of 18 seedlings per seed, the worst treatment was 2ip where only one study of the results obtained (7 mg.L).

**Key words:** Cytokinins, *Calibanus hookerij*, *nolinaceae*, ornamental.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillo:**

Por la oportunidad de realizar mis estudios en esta gran institución y el apoyo para mi formación académica.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:**

Por el financiamiento para la realización de mis estudios de postgrado.

### **A mí consejero Dr. Héctor González Rosas:**

Por haber colaborado con sus enseñanzas y consejos que fueron importantes para mi formación académica.

### **A mi asesor MC. Adrián Hernández Livera:**

Por su invaluable e incondicional apoyo otorgado en esta tesis.

### **A mi asesora Dr. Leticia Yolanda Fernández Pavía**

Por el importante apoyo otorgado.

### **Al Dr. Jorge Valdez Carrasco y Dr. Gabino García de los Santos:**

Por su apoyo en mi investigación.

**Para todos y todas muchas gracias.**



## **DEDICATORIA**

### **A Dios:**

Por darme la sabiduría, salud y la oportunidad de estar aquí.

### **A mi esposa, Jaqueline:**

Mi compañera de toda la vida a quien amo y agradezco el apoyo, el amor infinito, sus consejos incondicionales en las buenas y malas.

### **A mi hija, Xareni Alexandra:**

Por ser la motivación y alegría de mi vida para seguir adelante.

### **A las familias Núñez Medina, Núñez Coronado y Pérez Espino:**

Durante el desarrollo de esta tesis se presentaron diversidad de situaciones que pudieron ser fácilmente causantes del fracaso de esta, pero esto no sucedió, y fue gracias al apoyo presentado por diversas personas. Muchas gracias en esta etapa de mi vida.

**Con mucho cariño para todos ustedes.**

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos e hipótesis	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
1.1.3 Hipótesis	4
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>5</b>
2.1 Clasificación taxonómica de la subfamilia <i>Nolinaceae</i>	5
2.2 Identificación y descripción botánica de <i>C.hookerii</i> (Lem) Trelease (1911)	8
2.3 Morfología y anatomía de la semilla	16
2.4 Calidad de semillas	20
2.4.1 Componentes de la calidad	21
2.4.1.1 Calidad genética	21
2.4.1.2 Calidad física	21
2.4.1.3 Calidad fisiológica	23
2.4.1.4 Calidad sanitaria	27
2.5 Micropropagación	28
2.5.1 Tipos de crecimiento <i>in vitro</i>	29
2.5.2 Términos para identificar los principales tipos de propagación <i>in vitro</i>	30
2.6 Medios de cultivo	31

<b>2.7 Soluciones madre</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Análisis físico y descripción morfológica externa e interna de la semilla de <i>C.hookerii</i></b>	<b>34</b>
3.1.1 Morfología externa e interna de la semilla	34
3.1.2 Dimensiones de la semilla	35
3.1.3 Evaluación de la calidad física de la semilla	35
3.1.4 Análisis estadístico	37
<b>3.2 Prueba de germinación y análisis de viabilidad con tetrazolio en semilla de <i>C.hookerii</i></b>	<b>37</b>
3.2.1 Prueba de germinación	37
3.2.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio (2,3,5, cloruro de trifenil tetrazolio)	38
3.2.3 Análisis estadístico	40
<b>3.3. Micropropagación de <i>Calibanus hookerii</i> a partir de semillas como Explante</b>	<b>41</b>
3.3.1 Desinfección de la semilla	41
3.3.2 Cultivo <i>in vitro</i>	41
3.3.3 Germinación <i>in vitro</i>	42
3.3.4 Análisis estadístico	43
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Análisis físico y descripción morfológica externa e interna de la semilla de <i>C.hookerii</i></b>	<b>44</b>
4.1.1 Morfología externa e interna de la semilla	44
4.1.2 Dimensiones de la semilla	45
4.1.3 Calidad física de la semilla	46

<b>4.2 Prueba de germinación y análisis de viabilidad con tetrazolio en semilla de <i>C.hookerii</i></b>	<b>49</b>
4.2.1 Prueba de germinación	49
4.2.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio	54
<b>4.3. Micropropagación de <i>Calibanus hookerii</i> a partir de semillas como Explante</b>	<b>58</b>
4.3.1 Desinfección de la semilla	58
4.3.2 Germinación <i>in vitro</i>	60
4.3.3 Número y longitud de brotes	65
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>

<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Promedio de las dimensiones provenientes de la digitalización de imágenes de semillas de <i>C. hookerii</i> .	<b>46</b>
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de germinación de semillas de <i>C. hookerii</i> . Con y Sin testa.	<b>52</b>
<b>Cuadro 3.</b> Promedio de las dimensiones provenientes de la digitalización de imágenes de embriones de <i>C. hookerii</i> .	<b>57</b>
<b>Cuadro 4.</b> Cuadrados medios y significancia estadística de la variable longitud en semillas de <i>C. hookerii</i> .	<b>68</b>
<b>Cuadro 5.</b> Cuadrados medios y significancia estadística de la variable número de brotes en semillas de <i>C. hookerii</i> .	<b>68</b>
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de medias para los diferentes tratamientos con citocininas en semillas de <i>C. hookerii</i> .	<b>69</b>

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Agave</i> y <i>Dasyllirion</i> . Clasificación propuesta por Dahigre, Clifford y Jeo (1985).	6
<b>Figura 2.</b> Hábitos representativos de <b>A.</b> <i>Beaucarnea</i> , <b>B.</b> <i>Calibanus</i> , <b>C.</b> <i>Nolina</i> , y <b>D.</b> <i>Dasyllirion</i> .	10
<b>Figura 3.</b> Inflorescencias representativos de <i>Beaucarnea</i> , <i>Calibanus</i> , <i>Nolina</i> y <i>Dasyllirion</i> .	12
<b>Figura 4.</b> Estructuras reproductivas de <i>Beaucarnea</i> , <i>Calibanus</i> , <i>Nolina</i> , y <i>Dasyllirion</i> .	13
<b>Figura 5.</b> <b>A</b> , frutos representativos de cada género: vistas laterales y apicales, secciones transversales; <b>B</b> , semillas representativos de cada género: vistas laterales y apicales, sección transversal.	15
<b>Figura 6.</b> Esquema de la fecundación en una flor.	19
<b>Figura 7.</b> Fases del proceso de germinación en <i>Phaseolus vulgaris</i> .	25
<b>Figura 8.</b> Diferentes patrones de tinción que pueden presentar los embriones.	39
<b>Figura 9.</b> Morfología de la semilla de <i>C. hookerii</i> .	44
<b>Figura 10.</b> Estadios de la germinación de <i>Calibanus hookerii</i> .	53
<b>Figura 11.</b> Embriones viables e inviables.	56
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de germinación <i>in vitro</i> de semilla de <i>C. hookerii</i> .	60
<b>Figura 13.</b> Germinación <i>in vitro</i> de la semilla de <i>Calibanus hookerii</i> .	62
<b>Figura 14.</b> Número de brotes totales y citocininas.	66
<b>Figura 15.</b> Respuesta de la semilla de <i>C. hookerii</i> a los tratamientos con diferentes citocininas.	67

## I. INTRODUCCIÓN

Las regiones áridas y semiáridas de México contribuyen a la riqueza de la flora mexicana con cerca de 6000 especies de plantas vasculares, de las cuales alrededor del 60% son endémicas (Rezedowski 1978, 1991). Una de las comarcas secas más extensas en el territorio mexicano es el desierto de Chihuahua, provincia biogeográfica reconocida como un reservorio biológico de notable importancia. En la porción extrema sur y disyunta del cuerpo principal del desierto Chihuahuense se localiza la Zona Árida Queretana-Hidalguense, cuyo segmento meridional corresponde al sector del Semidesierto Queretano. *Nolina* y sus géneros relacionados *Beaucarnea*, *Calibanus* y *Dasyilirion*, han sido considerados dentro de las familias *Liliaceae* (Engler, 1888; Standley, 1920; Krause, 1930; McVaugh, 1989), *Agavaceae* (Hutchinson, 1934; Cronquist, 1981), *Dracaenaceae* (Brummitt, 1992) o *Nolinaceae* (Bogler, 1998; Walker, 2001). La familia *Nolinaceae* fue propuesta por Nakai (1943) y está constituida por los géneros anteriormente mencionados. Como resultado de algunos estudios filogenéticos publicados y con base en evidencias morfológicas y moleculares, *Nolina* y sus géneros emparentados han sido ubicados también en *Convallariaceae* (APG, 1998), *Ruscaceae* (APG II, 2003; Judd *et al.*, 2008) o como subfamilia *Nolinoideae* dentro de *Asparagaceae* (APG III, 2009). Sin embargo, esta última propuesta no considera a *Asparagaceae* como una familia monofilética.

La familia *Nolinaceae* incluye más de 50 especies adaptadas a las zonas áridas y semiáridas de México. Sus poblaciones naturales han disminuido de manera preocupante debido a la sobreexplotación y destrucción de su hábitat, por lo que el desarrollo de sistemas rápidos y eficientes para la propagación masiva de estas especies es una herramienta importante para su conservación y explotación racional. Algunas especies de la familia *Nolinaceae* son utilizadas por familias de zonas áridas y semiáridas como materia prima para fabricar escobas de paja, canastos y techado de casas (Krotchamal *et al.*, 1954 citado por Reyes, 2002); De las 272 especies del género *Agave* y 36 de los géneros *Dasyilirion* y *Nolina*, que se reportan para México y Centroamérica, existen 68 especies con usos medicinales, farmacológicos y etnobotánicos otras tiene uso medicinal y etnobotánico (Gioanetto y Franco, 2004). También son utilizadas como fuente de alimento para ganado (*Nolina texana*) (Cruse, 1949 citado por Reyes, 2002), además de tener un uso ornamental (Hernández, 1992; Infojardin, 2004).

Los ambientes en que se desarrollan algunas especies de *Nolinaceae* son fuentes de mortalidad para las plántulas ya que están expuestas a la interacción de periodos prolongados de sequía y la ocurrencia frecuente de temperaturas bajas extremas (López, 1986). En algunas especies la primera reproducción de la planta se lleva a cabo aproximadamente a los 68 años en promedio; de las plántulas que nacen solo 39% logra sobrevivir. Es importante considerar que también el potencial de los hongos patógenos son probables causas biológicas de la elevada mortalidad de plántulas (López, 1986).



En el caso de *Calibanus hokerii*, perteneciente a la familia de las *Nolinaceae*, hay poca información relacionada con la especie, la cual se encuentra en peligro de extinción en territorio mexicano debido a la sobreexplotación, al saqueo de ejemplares silvestres y la producción de semilla errática.

Con el presente estudio se pretende contribuir al conocimiento de la especie mediante el estudio de la morfología, viabilidad y germinación de la semilla; además de efectuar la micropropagación *in vitro* de la semilla, como una alternativa viable para esta especie vegetal amenazada cuya multiplicación por métodos convencionales, ya sea por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente (Pence, 2011).

## 1.1 Objetivos e hipótesis

### 1.1.1 Objetivo general

- a) Estudiar la morfología, viabilidad, germinación y micropropagación de la semilla de *Calibanus hookerii*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estudiar las características morfológicas de la semilla de *Calibanus hookerii*.
- b) Evaluar el contenido de humedad, peso volumétrico y peso de 1000 semillas de *Calibanus hookerii*.
- c) Valorar la calidad fisiológica de la semilla en términos de germinación y viabilidad.
- d) Evaluar diferentes dosis de los reguladores 6-Benciladenina (BA) y cinetina (K), 2-isopentil-adenina (2iP) y Tidhiazuron (TDZ) en la estimulación de la germinación de semillas de *Calibanus hookerii*.
- e) Establecer un protocolo de micropropagación con el fin de fomentar su preservación.

### 1.1.3 Hipótesis

- a) La siembra de la semilla *in vitro* y la adición de citocininas (BA, Cinetina, TDZ, 2ip) incrementará el porcentaje de germinación y estimulará la formación de brotes.
- b) La calidad física de las semillas afecta la viabilidad y el porcentaje de germinación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Clasificación taxonómica de la subfamilia *Nolinaceae*

La subfamilia *Nolinoideae* está integrada por los géneros *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyllirion* y *Nolina*, e incluye aproximadamente 55 especies herbáceas, arbustivas o arborescentes. Estas plantas habitan desde el sur de E.U.A., hasta Centroamérica; México tiene la mayor riqueza de especies. Hay reportes de que plantas de los géneros *Dasyllirion* y *Nolina* eran parte de la dieta de los nativos americanos hace más de 2000 años (Poinar *et al.*, 2001).

Especies del género *Nolina* se explotan para obtener fibras para cordelería, y algunas del género *Dasyllirion* se usan en el norte de México para elaborar una bebida alcohólica denominada “sotol”. El uso actual más extendido de estas plantas es el ornamental. Los géneros fueron inicialmente ubicado en la familia *Liliaceae*, posteriormente se le separó en *Agavaceae* y se le ha localizado en *Nolinaceae*. Recientemente se le ubica en la familia *Asparagaceae* y la subfamilia *Nolinaceae* (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, GRIN, 2013). Al parecer se relaciona fuertemente con los géneros *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* con los cuales comparte morfología, hábitat y características del fruto (**Figura1**).

Todas las especies del género *Beaucarnea*, así como muchas de los géneros *Dasyllirion* y *Nolina*, se comercializan masivamente con fin ornamental.

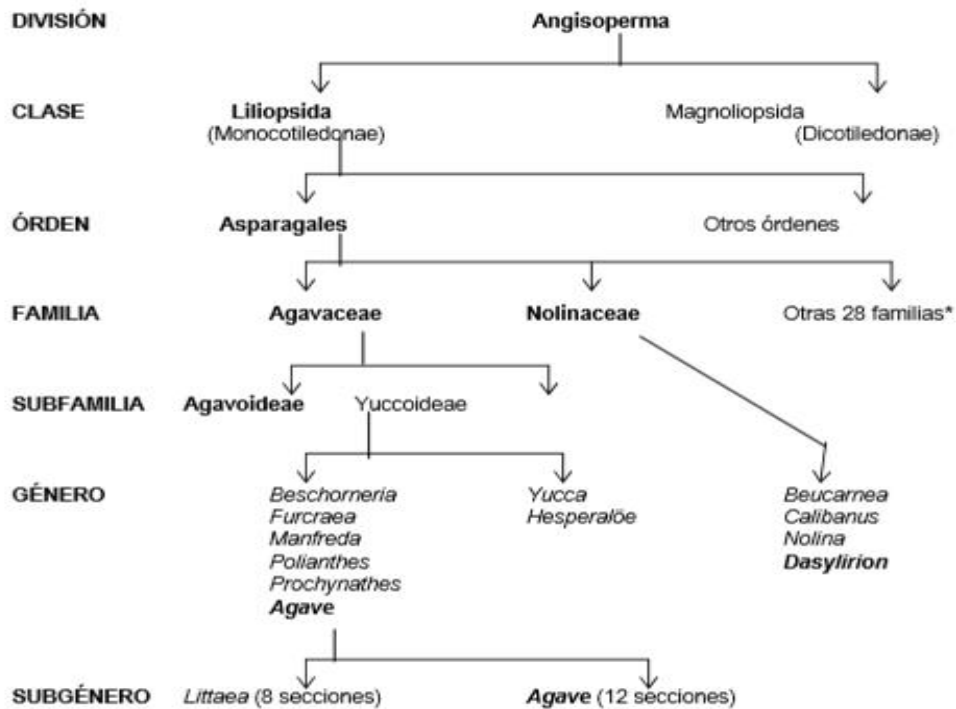


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Agave* y *Dasylirion*. Propuesta por Dahigre, Clifford y Jeo (1985).

Esto se debe a su belleza y a su muy bajo consumo de agua. Desafortunadamente, las poblaciones silvestres de casi todas las especies de *Nolináceas* se han reducido de manera importante en años recientes. Por este motivo, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye a 16 especies de esta familia en la lista de plantas en peligro, amenazadas o sujetas a protección especial.

Entre los factores que afectan la conservación de las *Nolináceas* destacan: 1) la destrucción y la modificación de los hábitats causadas por la expansión agrícola y la explotación forestal; 2) la ganadería, en especial el pastoreo de cabras, que puede devastar poblaciones completas; 3) la sobreexplotación como materia prima de algunas especies, y 4) el saqueo de ejemplares silvestres para su venta en el mercado

de ornamentales, situación especialmente grave en el género *Beaucarnea* (Cardel *et al.*, 1997; Golubov *et al.*, 2007).

Un estudio hecho por la Universidad de Nuevo León en el 2005, señala que se agregaron nueve especies al listado de plantas en peligro de extinción de la NOM-059-2001, en la que aparece *Calibanus Hookeri*, presente en los estados de Tamaulipas y Nuevo León (Torres, 2005).

Hay pocos estudios acerca del cultivo y la propagación *in vitro* de este grupo de plantas. Samyn (1997) reporta la propagación *in vitro* de *Beaucarnea recurvata* en un medio con benciladenina (BA) y ácido giberélico, obteniendo un poco más de tres nuevas plantas por explante. Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) propagaron *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata* a través de la generación de brotes en explantes tomados de plántulas obtenidas *in vitro*, usando sólo la citocinina y BA. Por su parte, Flores-García *et al.* (2008) reportan la propagación de la especie *Nolina parviflora* a través de organogénesis, a partir de explantes tomados de plántulas obtenidas *in vitro*, en medios de cultivo con combinaciones de citocininas con auxinas.

## **2.2 Identificación y descripción botánica de *C. hookerii* (Lem.) Trelease(1911).**

**Origen:** Norte y centro de México (Hidalgo, Tamaulipas y San Luis Potosí).

**Hábitat y ecología:** Crece en la arena, en un hábitat montañoso, seco, donde recibe agua muy abundante en el corto período de cultivo. Estas plantas son muy resistentes a la sequía, y han desarrollado un caudex (órgano de almacenamiento de agua) en y por debajo del nivel del suelo, una estrategia de supervivencia común en climas secos.

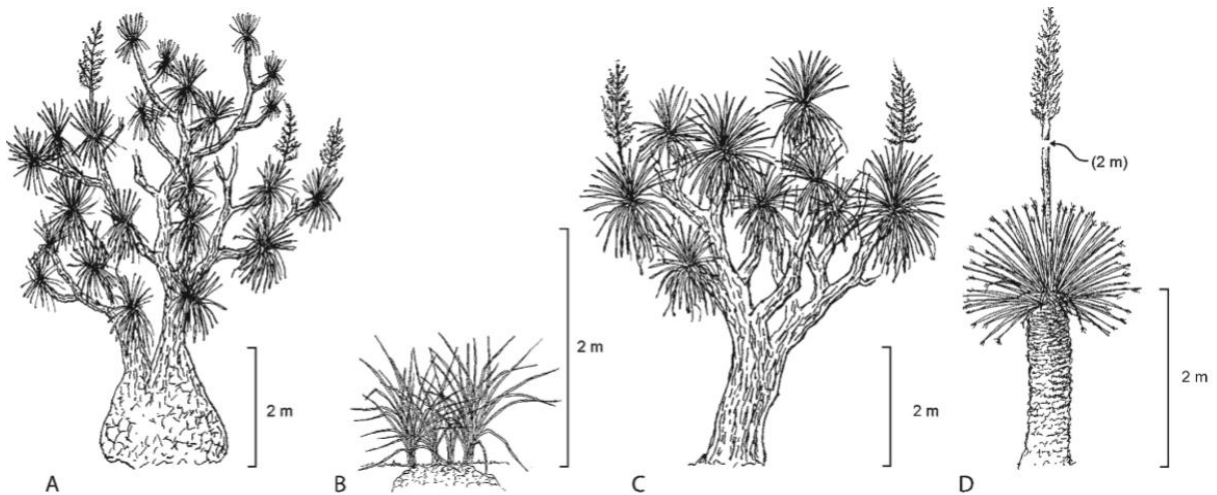
*Beaucarnea* cubre el rango altitudinal más amplio de los cuatro géneros, con especies que se encuentran desde el nivel del mar hasta más de 2000 m sobre el nivel del mar en el norte de México y América Central. Sin embargo, la mayoría de las especies se encuentran en alturas inferiores a 1500 m en bosques caducifolios tropicales. Especies que se encuentran en altitudes superiores a 1500 m, como *B. purpusii*, *B. gracilis* y *B. stricta*, se encuentran en matorrales xerófilos mexicanos. *Calibanus* también se encuentran en matorrales xerófilos en elevaciones entre 1000 y 2300 m. *Nolina* y *Dasyllirion* son en su mayoría característico de elevaciones por encima de 1500 m en las zonas tropicales.

**Hábitos:** Los cuatro géneros tienen hábitos similares, pero todos tienen atributos fácilmente identificables útiles en su identificación. Las especies *Beaucarnea* son en su mayoría arborescente, y se distinguen fácilmente de los otros géneros, debido a sus bases aumentadas (**Figura 2. A**), la mayoría de las especies alcanzan grandes alturas (5-18 m). *Beaucarnea compacta* es la excepción en cuanto a la altura, ya que está a menos de 1 m de altura. *Calibanus glassianus*, una de las dos especies de *Calibanus*, se asemeja a *Beaucarnea compacta* en su globular raíz cónica sobre el

suelo. Las otras especies de *Calibanus*, *C. hookeri*, tiene un tallo globular subterráneo o semi-subterráneos (**Figura 2. B**).

**Caudex:** La base caudiciforme es hemisférica y leñosa con una corteza de color marrón-gris fisurada o de placa y se encuentra en el suelo intermedio. Es de crecimiento muy lento, por lo general es de 0.30 a 1 m de diámetro pero con el tiempo puede crecer hasta 5 metros de diámetro, *Calibanus hookerii* se ve sin tronco, coronado por hierbas perennes como hojas de color azul plata que se expanden desde un caudex leñoso (Inflamación de la raíz suculenta).

**Corteza:** La corteza exterior o felema es útil en la identificación de los géneros. En *Beaucarnea* es lisa o de mosaico, a veces formando ranuras irregulares a lo largo de la longitud del vástago (**Figura 2. A**). *Calibanus* también tiene corteza de mosaico (**Figura 2. B**), y, en *Nolina*, la corteza es visiblemente más dura que en *Beaucarnea*, y tiende a formar ranuras longitudinales irregulares en las especies arborescentes, en lugar de patrones geométricos (**Figura 2. C**). En *Dasyllirion*, el caudex cilíndrico de especies caulescente está completamente cubierta por una capa de abundantes bases de las hojas persistentes (**Figura 2. D**). Esta característica es muy útil para distinguir *Dasyllirion* de los otros tres géneros.



**Figura 2.** Hábitos representativos de **A.** *Beaucarnea*, **B.** *Calibanus*, **C.** *Nolina*, y **D.** *Dasyllirion* (Tomado de Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. Rojas-Piña *et al.*, 2014. Systematics of *Beaucarnea* and *Calibanus*).

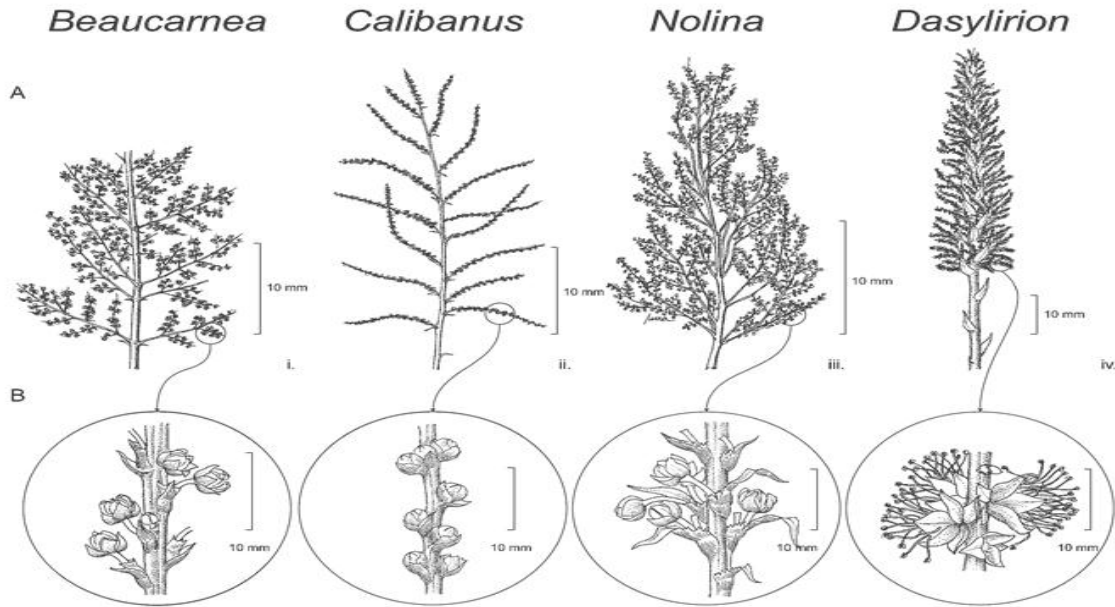
**Hojas:** Margen de la hoja, ápice de la hoja, ranuras de la hoja, y la superficie de la hoja son caracteres útiles en la identificación de los especímenes a nivel de género. Los cuatro géneros tienen hojas en rosetas terminales densas. Las láminas son largas y lineales, aciculadas o ensiformes o cuadrangulares como en *Dasyllirion longissimum* Lem. *Beaucarnea* y *Calibanus* tienen hojas con márgenes con forma de serrucho y ápices de las hojas completas. En *Calibanus hookerii* las hojas son delgadas y fuertes, flexibles, parecidas a hierva, superficie áspera que crece en posición vertical en el centro de la planta y luego arquea debajo a medida que maduran. Son algo cóncavas y quillas (conjunto de los dos pétalos inferiores de las flores papilionáceas.), los márgenes se han redondeado. Las hojas se miden de 30 a 90 cm de largo y sólo 3.2 mm de ancho. Ellas son de color verde- azul.



Aparecen en la planta como una corona formada por numerosos haces derivados de la parte superior del caudex. El número de los haces aumenta con el crecimiento de la planta.

**Inflorescencias:** Los cuatro géneros tienen tirso con órdenes primarias, secundarias, y, a veces terciarias (**Figura 3. A**). El último elemento del tirso es un rhipidium reducido (**Figura 3. B**). En *Beaucarnea*, *Calibanus* y *Nolina* (**Figuras 3. i-iii**), las ramas del tirso están considerablemente más largas que en *Dasyilirion*.

Los atributos que mejor reflejan la distinción entre los cuatro géneros son reproductivos, especialmente los de las flores pistiladas. Los cuatro géneros tienen flores hermafroditas pequeñas que generalmente tienen un sexo funcional (**Figura 4**). Son trímeras, actinomorfas e hipoginas, con seis segmentos del perianto imbricadas que a veces son reflejos en la antesis de las flores estaminadas (**Figuras 4. A, i e iii**). El pistilo de las flores estaminadas se extiende discretamente y apenas llama la atención en *Beaucarnea*, y es unilocular o trilocular (**Figura 4. A, i**). *Calibanus* y *Dasyilirion* el pistilo es sobre todo discreto (**Figura 5, A, ii y iv**), y en *Nolina* es en su mayoría prominentes y trilocular (**Figura 4. A, iii**). En *Dasyilirion*, *Beaucarnea* y *Calibanus* los segmentos del perianto son crenulados (**Figura 4. B, i, ii y iv**), mientras que en *Nolina* son papilas apicales (**Figura 4. B, iii**). El Gineceo en *Beaucarnea* y *Calibanus* es sincárpico, carnoso, liso y de pared gruesa (**Figura 4. i-ii**). En *Beaucarnea* es en su mayoría con 3 alas, y en *Calibanus* carece de alas (**Figura 4. i e ii**).

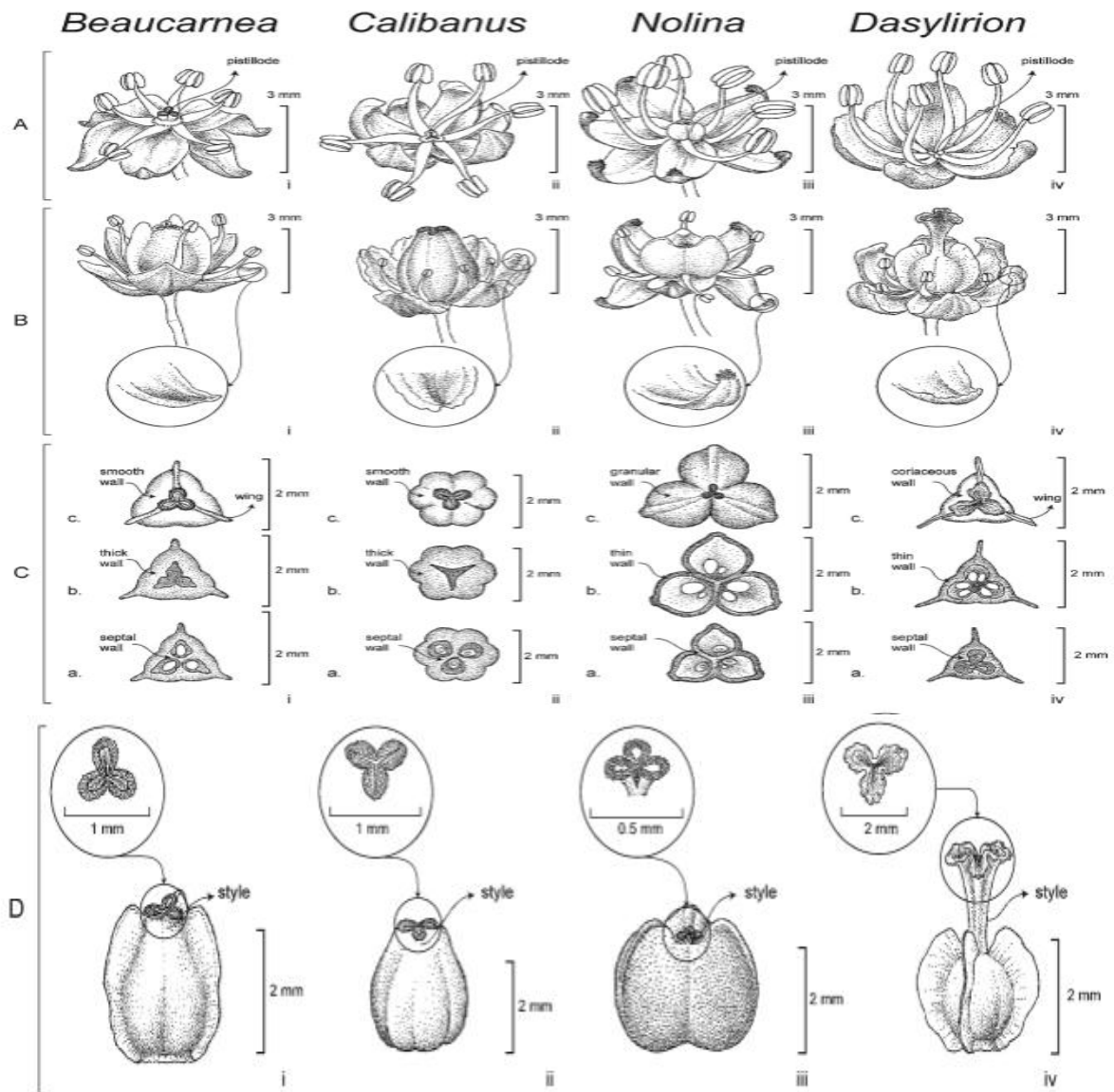


**Figura 3.** Inflorescencias representativos de *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Nolina*, y *Dasylirion*. **A.** Morfología general de inflorescencias, **B.** Detalle de las porciones floríferas de las inflorescencias (Tomado de Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea* Rojas-Piña *et al.*, 2014. Systematics of *Beaucarnea* and *Calibanus*).

En *Calibanus hookerii*, los racimos de flores (panículas) son rígidos alrededor de 10-20 cm de largo y parcialmente oculto en el follaje. Las flores son de color rosa o púrpura y muy pequeñas.

El ovario en *Beaucarnea* y *Calibanus* es unilocular con paredes septales basales fusionadas (**Figura 4. ia, iia**) y, a veces permaneciendo bien desarrollada la longitud de la ovario, pero nunca fundido (**Figura 4. C, ib y IIB**). La placentación en los cuatro géneros es basal y axilar (**Figura 4. C, a**). El estilo de *Beaucarnea* y *Calibanus* es corta para alargar ligeramente, carnoso, y lleva un estigma papilado de 3 lóbulos (**Figura 4. D, i e ii.**); en *Nolina* es corta, con cada carpelo que tiene su propio estigma papilado (**Figura 4. D, iii**); y en *Dasylirion* el estilo es prominente,

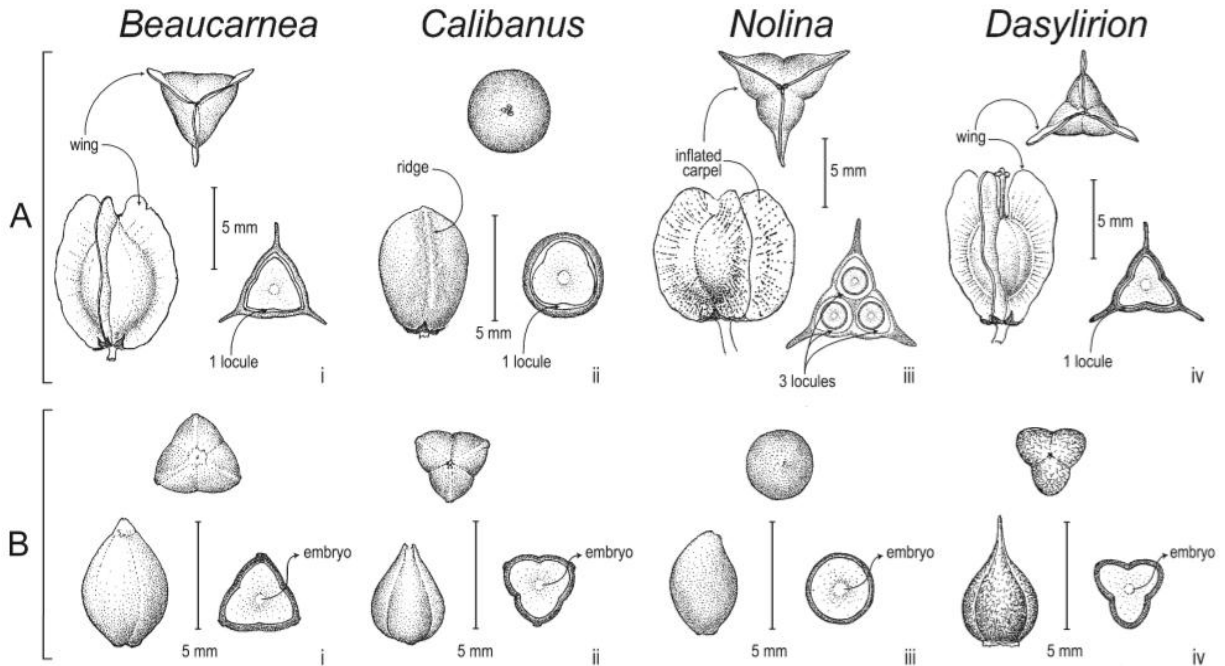
infundibuliforme (forma de embudo) hueco, hialina, y lleva un estigma de 3 lóbulos que carece de papilas (Figura 4. D, iv).



**Figura 4.** Estructuras reproductivas de *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Nolina*, y *Dasylirion*. **A**, flor estaminada; **B**, flor pistilada con una parte de segmento del perianto disminuido; **C**, vistas apicales del gineceo: **a**, corte transversal cerca de la base del ovario, **b**, sección transversal en el abdomen, y **c**, ápice; **D**, gineceo con una parte del estigma (Tomado de Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. Rojas-Piña et al., 2014. Systematics of *Beaucarnea* and *Calibanus*).

La principal diferencia morfológica entre *Beaucarnea* y *Calibanus* era el ovario de 3 lados o lóbulos de *Beaucarnea* contra el ovario 6 lóbulos de *Calibanus hookeri* (**Figura 4. C, i-ii**), y el ornamento de la fruta. A diferencia de *Beaucarnea*, *Calibanus* tiene frutos que carecen de alas, aunque *C. glassianus* tiene frutos con crestas (Hernández y Zamudio, 2003). Estas crestas probablemente representan alas reducidas que simplemente se redujeron aún más en *Calibanus hookeri* (**Figura 5. A**). Estas especies comparten algunas características morfológicas que pueden ser adaptaciones a ambientes más secos, con extremos más marcados de la temperatura y la sequía. Por ejemplo, tienden a tener robustos tallos y ramas, corteza gruesa y de mosaico, hojas glaucas (blanquecinas a verdes) casi rectas, ranuras papiladas y estomas profundamente hundidos. La mayoría de estas características sería plausibles y parece reducir la pérdida de agua durante las estaciones secas prolongadas.

**Frutos:** Los frutos en los cuatro géneros son cápsulas con dehiscencia retrasada (**Figura 5**). *Beaucarnea* y *Dasyllirion* tienen tres frutos alados (**Figura 5. A, i, iv**), con las alas siendo a veces reducidas (*B. compacta*). Los frutos de *Calibanus* y *Nolina* carecen de alas, pero en *Calibanus* cada carpelo tiene una cresta longitudinal medial (**Figura 5. A, ii**), y en *Nolina* cada carpelo está inflado o aumentado (**Figura 5. A, iii**). Las frutas en *Beaucarnea*, *Calibanus* y *Dasyllirion* son uniloculares (**Figura 5. A, i, ii, iv**), y en *Nolina* son triloculares (**Figura 5. A, iii**). En *Calibanus* es globoso, ovoide, con tres bayas de 8-9 mm de largo, 6-7 mm de diámetro. Los frutos son de paja de color marrón rojizo e indehiscente.



**Figura 5.** **A.** frutos representativos de cada género: vistas laterales y apicales, secciones transversales; **B.** semillas representativas de cada género: vistas laterales y apicales, sección transversal (Tomado de Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. Rojas-Piña *et al.*, 2014. Systematics of *Beaucarnea* and *Calibanus*).

Las semillas de *Beaucarnea*, *Calibanus* y *Dasylirion* son de 3 lóbulos y en su mayoría son simples (**Figura 5. B, i, ii, iv**), mientras que *Nolina* generalmente se desarrolla tres semillas esféricas (**Figura 5. B, iii**). El embrión en los cuatro géneros es cilíndrico (**Figura 5. B**).

En *Calibanus* la semilla mide 3-4mm de largo x 3 mm de ancho. <http://www.cactus-art.biz/schede/CALIBANUS/Calibanus hookerii/Calibanus hookerii/Calibanus hookerii.htm>.

### 2.3 Morfología y anatomía de la semilla

El inicio de la formación del fruto y la semilla se produce mediante la unión eficaz de los elementos reproductivos masculinos y femeninos, que dependen de la polinización y la fertilización. La polinización se produce cuando la antera llega a la madurez y comienza a liberar el polen para dar lugar al fenómeno de la polinización. La polinización no es más que un fenómeno necesario para la fertilización del óvulo y su posterior desarrollo e la semilla.

La polinización puede producirse como resultado de:

- a) Autopolinización, como consecuencia de la fecundación producida por el polen procedente de la misma flor, de flores del mismo individuo o de diferentes plantas del mismo clon (autogamia).
  
- b) Polinización cruzada, en la cual el polen procedente de una planta diferente o de un clon diferente (alogamia).

Las gimnospermas presentan una mayor tendencia a la autopolinización como una adaptación evolutiva en condiciones extremas y de aislamiento prolongado. Por el contrario, las angiospermas han desarrollado mecanismos orientados a favorecer la polinización cruzada, e incluso haciéndola obligatoria como resultado de su carácter dioico, o de la incompatibilidad genética de un mismo individuo (Sedgley y Griffin,

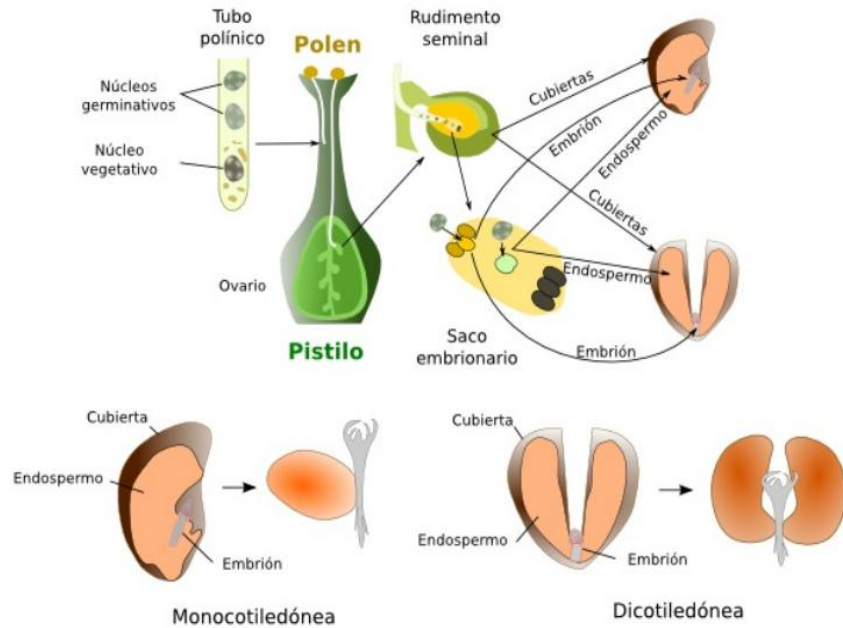
1989). La polinización que se produce al azar, utiliza diferentes medios en función de los cuales las especies se clasifican en:

1. Zoófilas: Transferencia de polen mediante la acción de animales, tales como insectos, aves o murciélagos.
2. Anemófilas: Utiliza como agente de dispersión el aire, produciendo cantidades muy grandes de polen que es distribuido de forma rápida y regular incluso a grandes distancias.
3. Hidrófilas: Supone la polinización por acción del agua, siendo el agente de dispersión menos generalizado.

En angiospermas cuando el grano de polen alcanza el estigma de una flor receptiva y germina, el proceso de fecundación da comienzo. El grano de polen es capturado por el estigma al contacto con una superficie pegajosa. La germinación es rápida, ocurriendo normalmente a las pocas horas o días. La mayor parte del polen que llega a los estigmas no germina, y se produce un aborto en las etapas iniciales del crecimiento del tubo polínico. El grano de polen germinado, con su núcleo y sus dos gametos masculinos, constituyen el microgametófito maduro. Normalmente el tubo polínico entra en el óvulo a través del micrópilo y se introduce en una de las sinérgidas, que empieza a degenerar poco después de que la polinización haya tenido lugar, pero antes de que el tubo polínico haya alcanzado el saco embrionario. En este momento, se liberan los dos gametos masculinos y el núcleo dentro de la sinérgida a través de un poro subterminal que se forma en el tubo polínico.

Finalmente, el núcleo de uno de los gametos masculinos entra en la ovocélula y se une con el ovonúcleo produciéndose la fecundación, y el núcleo del otro gameto entra, en la célula central donde se unen a los dos núcleos polares (Sedgley y Griffin, 1989). Este proceso recibe el nombre de doble fecundación, y es una característica única de las angiospermas. A partir de la doble fecundación se inician cuatro procesos: una célula espermática (N) se une a la ovocélula (N) para formar el cigoto que desarrolla el embrión (2N) de la semilla, el otro gameto masculino (N) se une con las células polares localizadas cerca del centro del saco embrionario, formando lo que será el endospermo típicamente triploide (3N) y funciona como una fuente de nutrientes para ayudar al crecimiento del embrión, los tegumentos se transforman en cubierta seminal; y la pared del ovario y estructuras relacionadas se transforman en el fruto. La semilla está protegida por el fruto y al germinar originará una nueva planta. En las gimnospermas, las escamas del cono se separan cuando el cono está receptivo, y se forman pequeñas secreciones, que facilitan la captura de los granos de polen. El tubo polínico penetra dentro del óvulo, y se liberan los dos gametos, uno se une a la ovocélula y el otro a los núcleos polares y normalmente se desintegra. El óvulo de las gimnospermas consiste en un intertegumento que rodea a la célula corporal, el gametofito femenino. La duración del periodo de tiempo entre polinización y fertilización es generalmente más largo en gimnospermas.





**Figura 6.** Esquema de la fecundación en una flor donde las cubiertas de la semilla se forman a partir del tegumento del rudimento seminal y el endospermo a partir de un núcleo germinativo con los núcleos centrales o polares, dando lugar a células triploides. El embrión se formará a partir de la unión entre la ovocélula y el núcleo germinativo.

**Embrión:** Está compuesto por un eje embrionario en cuyos extremos se encuentran una radícula y una plúmula, más uno o dos cotiledones.

**Endospermo secundario:** Es un tejido nutritivo que se encuentra a un lado o rodeando completamente al embrión. En el caso de las angiospermas procede de la fusión de un núcleo generativo con los dos núcleos centrales del saco embrionario formando un tejido triploide. En el caso de las gimnospermas este tejido nutritivo es haploide y se denomina endospermo primario. El endospermo es un tejido de reserva que proporciona nutrientes al embrión y a las primeras fases del desarrollo de la planta.

**Cubiertas protectoras:** Estas envueltas de la semilla se originan principalmente a partir de los tegumentos interno y externo del rudimento seminal, los cuales se convertirán en el tegmen y la testa de la semilla, respectivamente. Normalmente tegmen y testa están unidos y es difícil separarlos. Conjuntamente se denominan epispermo o cubierta seminal. El tegmen es normalmente delgado y flexible, mientras que la testa es dura. En la superficie de las semillas siempre hay una cicatriz denominada el hilio que corresponde al punto de unión del rudimento seminal con el funículo, pequeño cordón que une la semilla a la pared del ovario. También hay una pequeña abertura denominada micrópilo por donde puede entrar el agua para favorecer la germinación (Sedgley y Griffin, 1989).

## **2.4 Calidad de semillas**

La semilla es un insumo de gran importancia en el proceso productivo y su calidad es indispensable para implementación de labores tecnológicas adecuadas mejorando la producción y rentabilidad (Doria, 2010). La calidad de un lote de semillas comprende una serie de características o atributos que determinan su valor para la siembra; dentro de los más relevantes están pureza genética y calidad fisiológica, física y sanitaria (Bishaw *et al.*, 2007; Corbineau, 2012). En general una semilla de buena calidad es el principal requisito para el buen rendimiento de los cultivos, ya que de esta manera se producirán plantas fuerte, resistentes a enfermedades y a condiciones adversas (FAO, 1985). La calidad de la semilla es un concepto múltiple que comprende varios componentes y atributos entre los que se encuentran la fidelidad

del cultivar, daños mecánicos, capacidad y vigor de germinación, infecciones debidas a enfermedades, daños provocados por insectos, tratamientos químicos, tamaño, contenido de humedad y frecuencias de contaminantes tales como semillas de malezas comunes y nocivas, semillas de otros cultivos y materia inerte. Sin embargo, todos los análisis deben de considerarse de forma complementaria y no aislada para realizar un diagnóstico real y verdadero (Bustamante, 1993; Roca, 2003).

## **2.4.1 Componentes de la calidad**

### **2.4.1.1 Calidad genética**

La calidad genética de la semilla se refiere a las características que determina el fitomejorador al liberar una variedad. La calidad genética de las semillas es la más importante, debido a que garantiza que las plantas obtenidas a partir de ellas posean las características deseadas (Kelly, 1998).

Las características genética específicas a la constitución genética en la semilla proporcionan el potencial para altos rendimientos, mejor calidad de semilla y tolerancia a factores bióticos y abióticos (Bishaw *et al.*, 2007; Corbineau, 2012).

### **2.4.1.2 Calidad física**

La calidad física está asociada a la condición visible de la estructura o apariencia física de la semilla que se interpreta como la conservación de la integridad de la cubierta seminal, que puede ser alterada durante o después de la cosecha (McDonald, 1985).

Las características físicas de las semillas consideradas como factores de calidad son contenido de humedad, peso volumétrico y pureza física (Hernández, 1998). Adicionalmente se puede considerar el color, tamaño de la semilla, peso de mil semillas, daño por hongos e insectos, ausencia de semillas de maleza comunes y nocivas, y de otros cultivos (Castañeda *et al.*, 2009).

En lo que respecta a la humedad de las semillas, es un factor importante en la conservación o almacenamiento, ya que un alto contenido favorece el desarrollo de insectos y hongos (FAO, 2011), así como su efecto sobre los procesos fisiológicos de las semillas, trayendo como consecuencia un deterioro acelerado que disminuirá el vigor y la viabilidad (Moreno, 1996). Este deterioro puede incrementarse dependiendo de los niveles de temperatura, humedad del ambiente, humedad de la semilla durante el periodo de almacenamiento y la constitución química de la semilla.

El peso de la semilla es otro indicador de su calidad, ya que un cultivo sujeto a falta de nutrientes, deficiencias de agua, daño por heladas o granizo, se verá reflejado en su peso hectolitrito (Bustamante, 1983).

El peso volumétrico generalmente se expresa en kilogramos por hectolitro y es la relación que guarda el peso de la semilla en un volumen estándar de medida. El valor de este atributo está dado por la densidad y las características físicas de la semilla en cuanto a espesor y anchura (Rodríguez *et al.*, 2011).

Del peso de 1000 semillas, la ISTA (2012) indica que el objetivo de esta prueba es determinar el peso de 1000 semillas de la muestra de estudio. De la semilla pura se toman al azar ocho repeticiones de 100 semillas cada una. Cada repetición se pesa en gramos, después con los valores se calcula la varianza, desviación estándar típica y coeficiente de variación, si éste último no excede a 4.0, el resultado de la prueba es aceptable. El peso de mil semillas se obtiene multiplicando la media aritmética de las ocho repeticiones por 10.

#### **2.4.1.3 Calidad fisiológica**

Esta se refiere a la característica de viabilidad de las semillas, a la alta capacidad de germinación y de vigor para establecer nuevos individuos; calidad que es el resultado de la expresión de factores propios del genoma de la semilla y de su interacción con los factores ambientales que la rodean durante su desarrollo, cosecha y almacenamiento.

La calidad fisiológica es la capacidad de desempeñar funciones vitales, caracterizada por su germinación, vigor y longevidad (PoPONIGIS, 1977). Además comprende aquellos atributos intrínsecos que determinan su capacidad para germinar y producir poblaciones uniformes de plantas productivas bajo una amplia variación de condiciones ambientales (Andrade, 1992).

La viabilidad significa que una semilla es capaz de germinar y producir una plántula normal, por lo tanto se usa como sinónimo de la capacidad para germinación. La

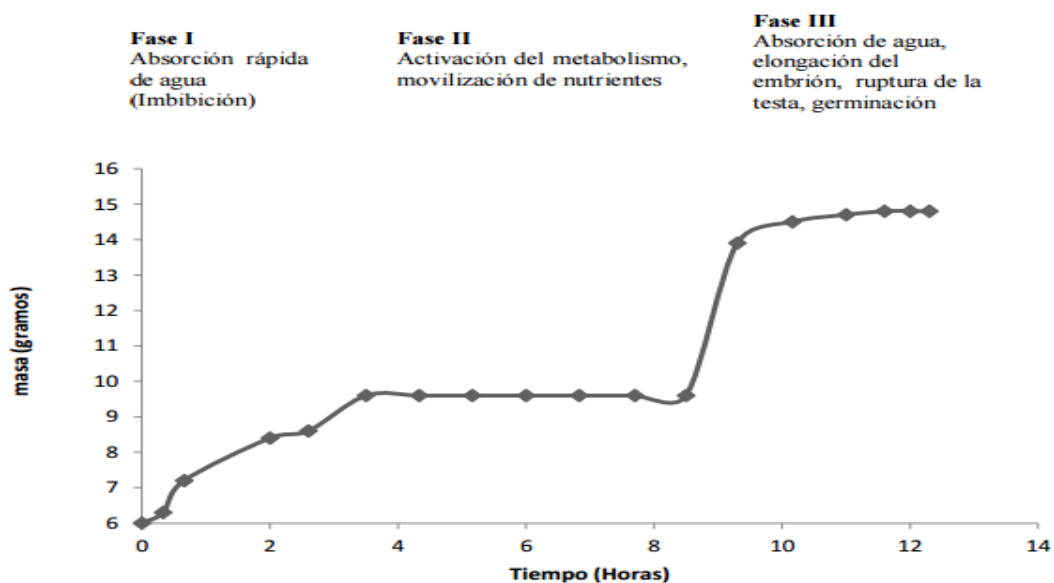
viabilidad denota el grado con el cual la semilla está viva, activa metabólicamente y posee enzimas capaces de catalizar las reacciones metabólicas necesarias para la germinación y el desarrollo de la plántula; en este contexto una semilla viva puede contener tanto tejido vivo como tejido muerto, y puede o no ser capaz de germinar (Copeland y McDonald, 2004).

El ensayo de viabilidad con tetrazolio se basa en que una vez que los diferentes tejidos de la semilla se han hidratado, en el embrión se activan rutas metabólicas, en las que muchas de las reacciones químicas empleadas son reacciones de oxidación. En estas reacciones se liberan electrones capaces de reducir a ciertas sustancias químicas. Este hecho puede ser utilizado para estimar el grado de actividad metabólica de los tejidos embrionarios y por tanto de su viabilidad (AOSA, 2002).

Las soluciones de estas sales (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) son incoloras, pero cuando se reducen se transforman en trifenilformazán, una sustancia estable, no difusible y de un color rojo intenso. Al colocar una semilla viable en contacto con una solución de tetrazolio, los electrones liberados, en los tejidos del embrión, reducirán a las sales de tetrazolio, con lo que éstos adquirirán un color rojo intenso; si la semilla no es viable, el embrión no cambiara de color. A veces, los embriones se colorean parcialmente, lo que indica la existencia de áreas de tejidos muertos, debido al deterioro de la semilla. En estos casos, la posición y el tamaño de las áreas necróticas, y no necesariamente la intensidad del color, es el índice que se utiliza para clasificar a las semillas como viables o no viables.

Para cada especie, la viabilidad de las semillas se evalúa mediante la comparación de las áreas coloreadas del embrión con los patrones de referencia establecidos por los organismos oficiales para el control de calidad de las semillas (AOSA, 2002).

La germinación comprende aquellos eventos que inician con la absorción de agua por la semilla (imbibición), el cual se da por las diferencias de potencial hídrico entre la semilla y la solución de imbibición. Este proceso consta de tres fases: I) incremento rápido en la absorción de agua; II) fase de estabilización y movilización de nutrientes; III) absorción de agua que generalmente coincide con el proceso de germinación (**Figura 7**). Usualmente el signo visible de que la germinación se ha completado, es cuando la radícula traspasa las estructuras que rodean al embrión, resultado que a menudo se conoce como germinación visible. La ISTA (2012) define germinación como la emergencia y desarrollo de la plántula a un estado donde el aspecto de sus estructuras esenciales indica si es apta para el desarrollo en una planta normal bajo condiciones favorables de suelo.



**Figura 7.** Fases del proceso de germinación en *Phaseolus vulgaris* (<https://www.researchgate.net/publication/258627099>).

La prueba de germinación estándar, que se considera la prueba universal de calidad de la semilla, evalúa el máximo de potencial de un lote de semillas (ISTA, 2012). Sin embargo, dado que la prueba se lleva a cabo en condiciones ideales, no necesariamente refleja el potencial de rendimiento de ese lote de semillas en campo (Shah *et al.*, 2002).

El vigor en especial, es un carácter determinado genéticamente y que se expresa desde las etapas iniciales del cultivo. Pérez *et al.* (2007) indica que el vigor de la plántula puede estar determinado por efectos genéticos aditivos y de dominancia, de modo que la constitución genética de los materiales es la que determina principalmente las diferencias del comportamiento.

La ISTA (2012) define el vigor de la semilla como la suma de las propiedades que determinan la actividad y desempeño de los lotes de semillas de germinación aceptable en un amplio rango de ambientes. Los aspectos del desempeño asociados con el vigor de las semillas incluyen: 1) Tasa, uniformidad de germinación y crecimiento de plántulas; 2) comportamiento en campo, incluyen la tasa y uniformidad de la emergencia de las plántulas y 3) Comportamiento después del almacenamiento y transporte, particularmente la disminución de la capacidad de germinación. Los factores que pueden determinar variaciones en el vigor son: constitución genética de la semilla; estado de madurez en la cosecha; tamaño, peso y peso específico de la semilla; integridad mecánica; deterioro y envejecimiento; patógenos; medio ambiente y nutrición de la planta madre (Copeland y McDonald, 2004), respecto al último factor Khan y Laude (1989) señalan que las condiciones



ambientales bajo las cuales madura la semilla pueden influir en la germinación, en el crecimiento y vigor de las plántulas en desarrollo y que tal comportamiento es atribuido a influencias ambientales en la semilla mientras estuvo unida a la planta madre.

En relación a las pruebas para evaluar el vigor de la semilla, se catalogan en dos tipos, en directas e indirectas, las primeras imitan las condiciones del campo y miden la habilidad de las semillas para emerger bajo condiciones de estrés simuladas en campo o en laboratorio (pruebas de frío, primer recuento, crecimiento de plántula, velocidad de emergencia y envejecimiento acelerado). Las pruebas indirectas miden ciertos atributos fisiológicos de la semilla en el laboratorio y son relacionadas con el establecimiento en campo, entre sus ventajas están las de poder ser efectuadas con mayor facilidad como en el caso de las pruebas de tetrazolio, tasa de respiración y conductividad eléctrica (Copeland y McDonald, 2004).

#### **2.4.1.4 Calidad sanitaria**

Según la ISTA (2012), la sanidad de semilla se refiere principalmente a la presencia o ausencia de organismos que causan enfermedades, tales como hongos, bacterias, virus y plagas, incluyendo nematodos e insectos. La condición sanitaria de un lote de semillas es el principal elemento de la calidad conjuntamente con la pureza y el poder germinativo.

## 2.5 Micropropagación

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* ( del latín en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica de cultivo *in vitro* consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Calva y Pérez, 2005). Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Al igual que en otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son idénticas a la planta madre (Matos *et al.*, 2000).

Cuando el explante (material inicial en cultivo *in vitro*, que puede ser un pedazo de tallo, hoja, yema o raíz) se coloca en un tubo de ensayo bajo las condiciones antes descritas, producirá pequeñas plántulas, réplicas del progenitor. El nuevo crecimiento es generalmente iniciado en tejido meristemático (conjunto de células no diferenciadas para su última función). Las células meristemáticas se encuentran localizadas en los ápices de los tallos y raíces, en las axilas de las hojas, en el cambium de tallos, en los márgenes de las hojas y en callos, así, estas células dependiendo de su base genética y localización e influenciadas por la luz, temperatura, hormonas y probablemente otros factores se diferencian en hojas, tallos,

raíces y otros órganos y tejidos de una manera organizada (Calva y Pérez, 2005). Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23 °C, además de controlar la cantidad de horas de luz.

### **2.5.1 Tipos de crecimiento *in vitro***

**Crecimiento organizado.** Se refiere al tipo de cultivo que se inicia con una parte organizada de la planta (ápices, hojas, brotes, semillas, etc) y esa parte u órgano sigue creciendo *in vitro* manteniendo sus características estructurales. Se aplica también cuando se desarrolla una estructura a partir de un tejido desorganizado (organogénesis).

**Crecimiento desorganizado.** Este tipo de crecimiento se caracteriza porque a partir de fragmentos de tejidos u órganos se produce un tejido sin estructura específica que contiene un número limitado de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado o callo puede crecer con subcultivos y puede ser mantenido en medio sólido o líquido durante varios meses o años. Puede ser usado para iniciar suspensión de células y protoplastos.

## 2.5.2 Términos para identificar los principales tipos de propagación *in vitro*

**Cultivo de órganos.** Corresponde al cultivo de un órgano de la planta con el fin de propagar la planta. Cultivo de meristemas o de ápices, microestacas, cultivo de embriones.

**Callos.** Corresponde a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse (célula meristemática o embriogénica).

**Suspensión de células.** Las suspensiones celulares consisten de células libres y microagregado de células en medio líquido en movimiento.

**Cultivo de protoplastos.** Es el cultivo de células sin pared pectocelulósica. Es decir, células con los componentes vivos rodeados solamente por la membrana citoplásmica. Debido a la ausencia de pared celular los protoplastos son adecuados para trabajos en manipulación genética que no serían posibles con plantas o células intactas.

**Cultivo de anteras.** Consiste en el cultivo de anteras enteras con polen inmaduro, el polen se divide para formar embriones o callo. Cuando éstos se transfieren a los medios de regeneración se forman plantas. Por lo general el cultivo de anteras se

utiliza para la obtención de plantas haploides. Estas se regeneran a través de la embriogénesis somática a partir del polen, directamente o por vía de organogénesis a partir de un callo.

## 2.6 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*.

Los ingredientes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse en:

**Sales inorgánicas.** Los elementos mayormente esenciales que todas las plantas requieren y que están presentes en los fertilizantes comunes, también forman parte de los medios de cultivo: nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio y hierro. Además de los elementos menores, que también son esenciales pero que se requiere en cantidades extremadamente pequeñas: boro, molibdeno, manganeso, cobalto, zinc, cobre, cloro, yodo. Una de las mezclas más usadas es el MS (Murashige y Skoog, 1962).

**Compuestos orgánicos.** En esta categoría se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para el cultivo de tejidos: aminoácidos, amidas, purinas y pirimidinas además de ácidos orgánicos.

**Los carbohidratos:** son sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos mayores esenciales: hidrogeno, carbono y oxígeno. Los azucares son producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que se adicionan altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo.

**Hormonas:** las sustancias más usadas son auxinas y citoquininas, estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de las semillas. Entre las auxinas más utilizadas se encuentra: ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), 2,4-D, picloram. Entre las citoquininas se encuentran: benzilaminopurina (BA), kinetina (K) y zeatina.

**Vitaminas:** la más importante es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia por estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantolenato, ribloflavina.

**Aminoácidos:** los más utilizados son L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-tirosina. Otros compuestos orgánicos empleados son el inositol, adenina, sulfato de adenina, ácido cítrico y ascórbico (para evitar la oxidación de los tejidos).

**Materiales inertes.** Geles húmedos que actúan como agentes de soporte: agar, gelrite, fitogel. Carbón activado que en bajas concentraciones contrarresta efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas al medio por el cultivo (fenoles).

## 2.7 Soluciones madre

Un método que permite hacer menos tedioso el trabajo consiste en preparar lo que se conoce como "soluciones madre" de algunos de estos componentes. Estas soluciones tienen una concentración que suele ser 10, 100 e incluso 1000 veces superior a la concentración final del medio. Su ventaja no estriba sólo en el hecho de que hay que pesar menos veces cada vez que se prepara el medio sino también la exactitud de la pesada ya que algunos compuestos están tan diluidos en la solución final, que la pesada que habría que hacer estaría por debajo de los límites de exactitud de las balanzas de precisión. Las soluciones madre se conservan en frigorífico y en bote tapado durante algunos meses, desechándose ante cualquier señal de precipitación.

Se suelen preparar soluciones madre de las sales minerales, los aminoácidos, hormonas, vitaminas y hexitales, mientras que la fuente de carbono y el agente gelificante se pesan cada vez ya que se necesitan en cantidades muy elevadas y no se conservan bien en solución.

En el caso de las hormonas es mejor preparar una solución madre de cada una de ellas y medir volúmenes determinados. Se prepararon soluciones madre de las sales minerales, vitaminas, aminoácidos y hormonas necesarias para el medio MS.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Análisis físico y descripción morfológica externa e interna de la semilla de *Calibanus hookerii*.**

Esta etapa del estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Producción de semillas del Colegio de Posgraduados. Campus Montecillo. Estado de Mexico.

Las semillas de *Calibanus hookerii* utilizadas en la investigación fueron donadas por el Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

##### **3.1.1 Morfología externa e interna de la semilla.**

Para estudiar la morfología de la semilla, se utilizó una muestra de 100 semillas, a las cuales se les realizaron cortes longitudinal y transversal para observar, en un microscopio estereoscópico, la posición del hilio, micrópilo, embrión y endospermo. Para obtener las fotos de las semillas se usó un microscopio Tessorar de Carls Zeiss con cámara digital para microscopía PAXcam 3. Las imágenes digitales se editaron con el programa GIMP 2.8.4. La morfometría se hizo con el programa imágenes ImageJ 1.45s (National Institute of Health, USA, 2012).



### **3.1.2 Dimensiones de la semilla.**

Para obtener los caracteres de imágenes de semillas mediante computadora, se cortaron al azar dos repeticiones de 100 semillas cada una, colocando cada repetición en una hoja de papel, para después realizar el análisis de imágenes usando un escaner a color marca Epson, modelo ES-1000C, una computadora de escritorio y el programa de procesamiento de imágenes ImageJ 1.45s (National Institute of Health, USA, 2012). Las semillas se escanearon por repetición, obteniéndose las imágenes respectivas, que posteriormente se guardaron en el disco duro de la computadora y se procesaron mediante el programa de cómputo indicado. Las variables obtenidas fueron: área, perímetro, longitud (eje mayor), ancho (eje menor) (García y Estrada, 1999).

### **3.1.3 Evaluación de la calidad física de la semilla.**

De la semilla de *Calibanus hookerii* se obtuvo una muestra de 20 gramos libre de impurezas para evaluar la calidad física de la semilla.

#### **Variables evaluadas.**

**Contenido de humedad.** Se determinó el contenido de humedad por el método de la estufa a 130°C por una hora; se usaron cajas de aluminio con tapa, dentro de las cuales se colocaron 2 gramos semilla entera de calibanus, obteniendo su peso húmedo y seco, antes y después del secado, respectivamente. Se realizó en dos

repeticiones. El resultado se calculó mediante la siguiente fórmula y se reportó en porcentaje (ISTA, 2005).

$$\% \text{ Humedad (con base en peso humedo)} = \left[ \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \right] \times 100$$

En donde:

P1= Peso de la caja y su tapa (g)

P2= Peso de la caja, tapa y semilla antes del secado(g)

P3= Peso de la caja, tapa y semilla después del secado en la estufa (g)

**Determinación de peso volumétrico.** En una probeta de 12 ml se depositaron 5 g de semilla, posteriormente se efectuó la lectura del volumen ocupado (ml), este procedimiento se realizó en cuatro repeticiones. El resultado se calculó con la siguiente formula.

$$\text{Peso Volumétrico (KghL}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{\text{Peso de la semilla (g)}}{\text{Volumen ocupado (ml)}} \right] \times 100$$

**Peso de 1000 semillas.** De la semilla de *Calibanus* se tomarón ocho repeticiones de 100 semillas cada una, y cada repetición se peso en una báscula electrónica. Con los pesos se calculó la varianza, la desviación estandar y es coeficiente de variación (ISTA, 2010). Si el coeficiente de variación no excedió al 4.0, el valor de esta variable se acepta y es estadísticamente confiable (Moreno, 1996). El peso de 1000 semillas (P1000S) se calculó a partir de las ocho repeticiones mediante la siguiente fórmula (ISTA, 2010):  $P1000\text{semillas} = \bar{X} \times 10$

### **3.1.4 Análisis estadístico.**

El área, perímetro, longitud (eje mayor) y ancho (eje menor), fueron analizadas mediante un análisis de varianza ( $p < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2000).

## **3.2 Prueba de germinación y análisis de viabilidad con tetrazolio en semilla de *Calibanus hookerii*.**

### **3.2.1 Prueba de germinación.**

La evaluación de la calidad fisiológica de las semillas se hizo de acuerdo a la International Seed Testing Association (ISTA, 2010), se utilizaron cuatro repeticiones de 25 semillas cada una, empleando el método “sobre papel”. Las semillas se colocaron en cajas de plástico transparente de 15x15 cm, y fueron puestas en un cuarto de germinación a temperatura constante de 25°C. Se realizaron dos conteos el primero a los 10 días y el segundo a los 20 días de establecida la prueba.

### **VARIABLES EVALUADAS.**

**Germinación:** Se evaluó en base al número de plántulas normales, sanas y sin malformaciones, a los 20 días de iniciada la prueba y fue expresado en porcentaje.

**Plántulas anormales:** Se determinó en base al número de plántulas que presentaron malformaciones en la raíz y hojas, que impidieron un desarrollo normal y se expresa en porcentaje.

**Semillas no germinadas:** Semillas que no presentaron germinación al final de la prueba y fue expresado en porcentaje.

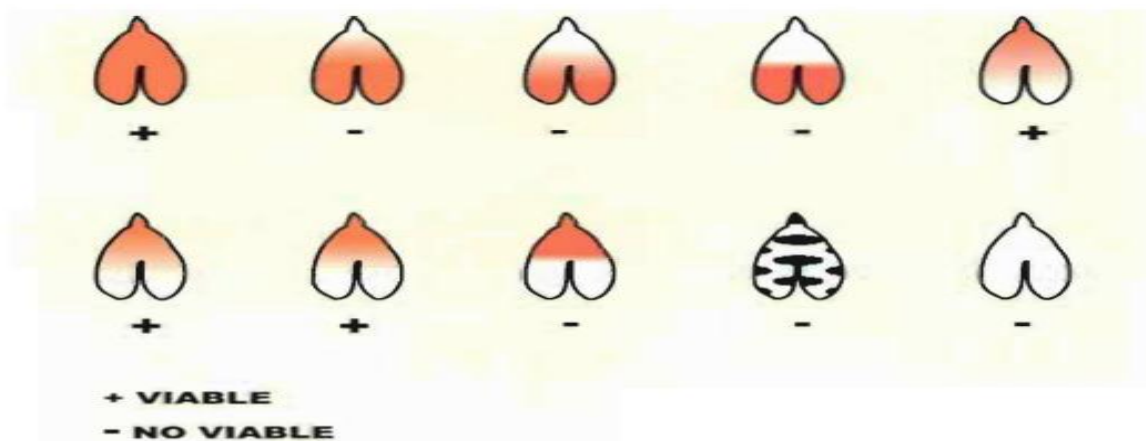
### **3.2.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio (2,3,5, cloruro de trifenil tetrazolio).**

Para medir la viabilidad de los embriones, se empleó la metodología de tinción con 2,3,5, cloruro de trifenil tetrazolio, propuesta por la Asociación Internacional de analistas de las semillas (ISTA, 2010). Se utilizaron 100 semillas de *Calibanus* para establecer cuatro repeticiones de 25 semillas cada una. Las semillas se acondicionaron durante 24 horas en agua desionizada. Posteriormente se extirparon los embriones y se remojaron 48 horas en la solución de tetrazolio a una temperatura de 30°C. Trascurrido el periodo de tinción, los embriones se sacaron de la solución, se enjuagaron con agua desionizada y permanecieron todo el tiempo en contacto con agua mientras se hizo la evaluación de la prueba. El tetrazolio interactúa con los procesos de reducción y oxidación de las células vivas en la semilla, por lo cual, las formas hidrogenadas cambian de color, lo que hace posible distinguir las partes vivas (coloreadas) de aquellas muertas (incolores) (Poulsen *et al.*, 2006; ISTA, 2010). Utilizando la siguiente fórmula se calculó el porcentaje de semillas viables.

$$\% \text{ Viabilidad} = \left[ \frac{\text{Número de semillas viables teñidas de rojo}}{\text{Número total de semillas}} \right] \times 100$$

### Evaluación de la prueba de tetrazolio.

Como *Calibanus hookerii* es una especie para la que no existen protocolos en las normas de la ISTA para evaluar la prueba de viabilidad con tetrazolio, ésta se llevó a cabo con base en observaciones cuidadosas y aplicando criterios derivados de los patrones de tinción observadas en las semillas de *Calibanus* y los definidos para otras especies, y tomando como base los parametros de tinción de la **Figura 8**, se clasificaron los embriones.



**Figura 8.** Diferentes patrones de tinción que pueden presentar los embriones, deben ser evaluados según las tablas establecidas para diferentes especies, por los organismos de control de calidad de semillas.

Se calificaron como viables todos los embriones que presentaron coloración rojo intenso y con la tinción cubriendo la totalidad del tejido o la mayor parte de él; como

de baja viabilidad aquellos cuya coloración fue de un tono rosa ligero pálido pero con tejido teñido en su totalidad; y finalmente se clasificaron como embriones no viables, todos los que presentaron ninguna coloración o bien aquellas en donde las estructuras del embrión como la radícula no se tiñieron; ya que esto es un indicativo de que dicho embrión no dará origen a una plántula normal, pues carecerá de la raíz (ausencia de tinción en la radícula) o plúmula (ausencia de tinción en yema), según sea el caso. Los resultados son expresados en porcentaje.

Para obtener las fotos de los embriones se usó un microscopio Tessoar de Carls Zeiss con cámara digital para microscopia PAXcam 3. Las imágenes digitales se editaron con el programa GIMP 2.8.4. La morfometría se hizo con el programa imágenes ImageJ 1.45s (National Institute of Health, USA, 2012). Además, de la prueba de terazolío, fueron seleccionados embriones completos para obtener las siguientes variables: longitud (eje mayor) y ancho (eje menor) (García y Estrada, 1999).

### **3.2.3 Análisis estadístico.**

Se utilizó un diseño experimental al azar con tres repeticiones, los datos se analizaron con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2000).

### **3.3 Micropropagación de *Calibanus hookerii* a partir de semillas como explantes**

Esta etapa del estudio se realizó en el laboratorio de embriogénesis del Posgrado de Fruticultura, ubicados en el Campus Montecillo del Colegio de Posgraduados, ubicado en las coordenadas son 19°27'30" L N y 98°54'14" L O, con una altitud de 2240 msnm.

#### **3.3.1 Desinfección de la semilla.**

Previo a la desinfección de las semillas se les retiró la testa, se lavaron con agua y jabón por 10 minutos, esto con el fin de eliminar la grasa de la superficie de la semilla. Posteriormente se enjuagaron las semillas con agua corriente hasta que el jabón desapareció. Luego se sumergieron en peróxido de hidrógeno por cinco minutos, nuevamente se enjuagaron con agua corriente por dos minutos por tres repeticiones. Se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 20% por dos minutos y por último se enjuagaron con agua estéril tres veces. Previo a la siembra, las semillas se impregnaron con Benomyl para controlar la posible presencia de hongos.

#### **3.3.2 Cultivo *in vitro*.**

Las semillas se sembraron en medio básico Musashige y Skoog (MS 1962) complementado con cuatro citocininas (BA, TDZ, K y 2ip) en concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.0 mg.L y el testigo. Se sembró una semilla por tubo de ensayo de 150 x 25

mm en campana de flujo laminar previamente desinfectada y se realizaron 30 repeticiones por tratamiento para un total de 90 semillas. Cada tubo contenía 20 ml de medio de cultivo MS adicionado con 30 g/L de sacarosa y 8.0 g/L de agar.

Previa a la adición del agar, el pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1N y HCl 0.1N. El medio de cultivo se esterilizó en el autoclave a 121 °C a 15 libras de presión durante 15 min. Todos los tubos de ensayo se incubaron en cámaras de crecimiento a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo un flujo total de fotones de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provista por lámparas fluorescentes y un fotoperiodo de 16 h y 8 de oscuridad.

### **3.3.3 Germinación *in vitro*.**

Las semillas se monitorearon diariamente durante 28 días para verificar que no existiera contaminación y para registrar el porcentaje de germinación, se realizó un conteo de las semillas germinadas durante 28 días. Se consideró como semilla germinada cuando la radícula comenzó a emerger (Ranal y García, 2006). A los 28 días las plántulas se sacaron del tubo para evaluar el número y longitud de los brotes, para posteriormente pasar esos brotes a medio MS sin hormonas para su enraizamiento y posterior aclimatación, cabe hacer notar que esta última etapa ya no se realizó por cuestiones de tiempo y espacio.



#### **3.3.4 Análisis estadístico.**

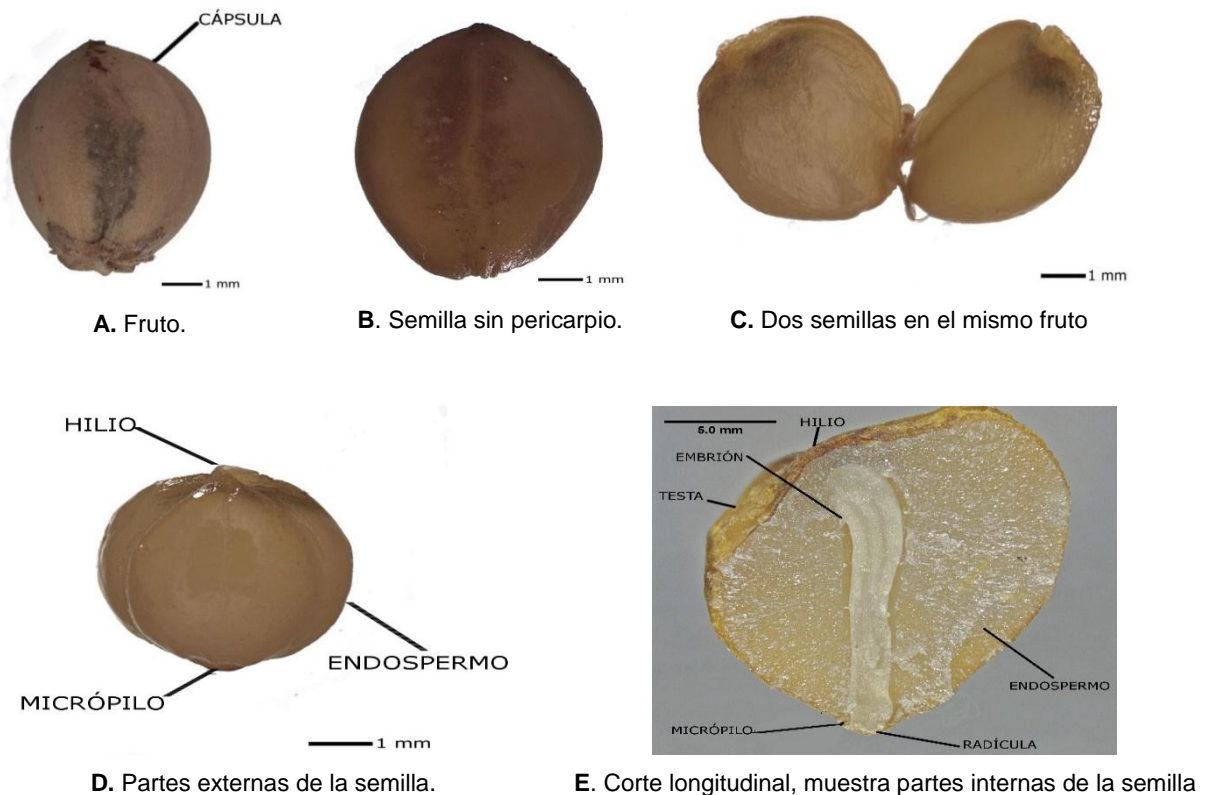
Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DECA) con tres repeticiones para el análisis del número y longitud de los brotes se utilizó el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2000).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis físico y descripción morfológica externa e interna de la semilla de *Calibanus hookerii*

#### 4.1.1 Morfología externa e interna de la semilla.

El fruto es una cápsula de forma circular u ovoide (**Figura 9. A**), puede presentar una sola semilla o dos en un mismo fruto (**Figura 9. B-C**). La semilla al igual que el fruto puede presentar forma ovoide o circular. El hilio se encuentra ubicado en el extremo puesto de la radícula; la cubierta seminal es de superficie corrugada-reticulada (con retícula grande), color blanco-marrón (**Figura 9. D**). La semilla presenta endospermo, de tipo entero con superficie lisa. El tamaño del embrión es de menos de  $\frac{1}{4}$  con respecto al tamaño de la semilla, la posición y forma que presenta es axial (**Figura 9. E**).



**Figura 9.** Morfología de la semilla de *C. hookerii*. **A.** Fruto, **B.** Semillas sin pericarpio, **C.** Dos semillas en el mismo fruto, **D.** Partes externas de la semilla, **E.** Partes internas de la semilla.

En *Calibanus hookerii* se observó que la semilla es trilobulada, contiene un embrión que es de forma cilíndrica, contiene un endospermo liso y tiene frutos con alas reducidas, lo que es similar con lo mencionado por Rojas-Piña *et al.*, 2014 para *Calibanus hookerii*. En *Calibanus glassianus* los frutos tienen crestas, estas crestas probablemente representan alas reducidas que simplemente se redujeron aún más en *Calibanus hookerii*. Estas especies comparten algunas características morfológicas que pueden ser adaptaciones a ambientes más secos, con extremos más marcados de la temperatura y la sequía. El estudio de la morfología nos podría ayudar a seleccionar la mejor o las mejores semillas para obtener plantas más vigorosas o con los mejores caracteres para su propagación. Además se observó que un mismo fruto contiene dos semillas (**Figura 9. C**) este carácter no ha sido reportado por otros autores en *Calibanus hookerii* o alguna especie emparentada, lo que da un área de oportunidad para estudios posteriores en *Calibanus hookerii*, para saber si las dos semillas son funcionales o no.

#### **4.1.2 Dimensiones de la semilla.**

Los resultados obtenidos en la prueba de medias para las variables de dimensiones de la semilla se muestran en el **Cuadro 1**. Los caracteres de la semilla analizados por digitalización de imágenes muestran los valores promedio para el área, perímetro, longitud y ancho de la semilla.

**Cuadro 1.** Promedio de las dimensiones provenientes de la digitalización de imágenes de semillas de *Calibanus hookerii*.

Área (cm <sup>2</sup> )		Perímetro (cm)		Longitud(mm)		Ancho (mm)	
$\bar{X}$	C.V	$\bar{X}$	C.V	$\bar{X}$	C.V	$\bar{X}$	C.V
10.94	0.21	12.55	0.14	3.99	0.12	3.44	0.14

$\bar{X}$ =Promedio; C.V= Coeficiente de variación

En las semillas de *Calibanus hookerii* la longitud varió de 4.03-3.9 mm, con un promedio de 3.99 mm, mientras que para el ancho la variación fue de 3.5-3.3 mm, con un promedio de 3.44 mm, considerando que *Calibanus hookerii* esta emparentada con los generos *Beaucarnea*, *Dasyilirion* y *Nolina*, la semilla tiene un tamaño similar a las semillas de los géneros antes mencionados. Al respecto Hernandez (1992) reporta para semillas de *Beaucarnea hiriartiae sp.*, un largo de 3.5 a 4 mm y 3 a 3.2 mm de ancho. Las semillas de *nolina excels*, tiene un largo de 3.5-4.2 mm, 3-3.8 mm de ancho (Solano *et al.*, 2012).

De la misma forma Rivera-Lugo y Solano (2012) realizaron un estudio de la flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán en la cual midieron el largo y ancho de diferentes especies de *Beaucarnea*, *Dasyilirion* y *Nolina*. Para *Beaucarnea Lem*, las semillas son de 3.5-4.0 mm largo, 3.0-4.0 mm ancho, para *Beaucarnea purpusii* 4.0-4.5 mm largo, 3.0-3.5 mm ancho, *Beaucarnea stricta* 3.5-5.0 mm largo, hasta 3.5 mm ancho, *Dasyilirion lucidum* 3.0 mm largo, 2.0 mm ancho, *Dasyilirion serratifolium* hasta 3.0 mm largo, 2.0-2.5 mm ancho y por último *Nolina parviflora* 3.0-4.0 mm largo, 3.0-3.5 mm ancho. Al comparar los resultados obtenidos con los de otros autores, se evidencia que existe mucha similitud de *Calibanus hookerii* con las especies antes

mencionadas (**Cuadro 1**). Para el área de la semilla se obtuvo un promedio de 10.94 cm<sup>2</sup>, y por último el perímetro con un promedio de 12.55 cm. Las variables área y perímetro de la semilla no se pudieron comparar con otros resultados pues no se encontraron pruebas similares con especies emparentadas con *Calibanus hookerii*.

#### **4.1.3 Calidad física de las semilla.**

##### **Contenido de Humedad.**

No existe información científica respecto al contenido de humedad en las semillas de *C. hookerii* el cual fue de 6%. Serrano *et al.* (2000) reportan para semillas de *Polygonum L. (Agavaceae)* un promedio de 20%. Al comparar con lo resultados obtenidos la semilla de *C. hookerii* tiene un menor contenido de humedad, quizá debido a que en el ambiente donde se desarrolla se presentan sequías prolongadas. Lo que es una adaptación de la planta a condiciones adversas del ambiente, para asegurar su supervivencia y continuidad.

##### **Peso volumétrico.**

El peso volumétrico obtenido para *Calibanus hookerii* fue de 29.4 Kg hL<sup>-1</sup>. Este dato no se pudo comparar debido a que no encontramos algún dato bibliográfico similar en alguna especie emparentada con *Calibanus hookerii*.

### **Peso de 1000 semillas.**

El promedio fue de 31 semillas por gramo y el peso de 1000 semillas fue de 35 g. Aunque no se encontró un dato similar en especies emparentadas con *Calibanus hookerii*. El peso de las semillas es un dato de mayor interés, pues es natural que para aquellas semillas destinada al inmediato consumo humano o animal, se trate de que el peso sea el mayor posible, esto ha llevado a que algunos estudiosos a separar aquellas variedades de mayor peso por grano y en este sentido obtengan una mejor calidad de las semillas mediante una rigurosa selección. El peso nos podría ayudar a seleccionar las mejores semillas de *Calibanus hookerii*, para obtener plantas de mejor calidad para propagación y conservación de esta especie.

En las especies de la familia *Nolinaceae* no hay un valor estándar para las semillas P1000 y Peso volumétrico como otras especies (maíz y frijoles) que son indicadores de la calidad de la semilla como fue establecido por ISTA (2005). Es por esta razón, que los valores encontrados de estas variables son la primera contribución de la especie *Calibanus hookerii*. Además, la descripción de las características morfológicas establecidas por otros autores como Rojas-Piña *et al.*, 2014, complementa el conocimiento con respecto a la especie de este trabajo y podría servir como características de clasificación.

## **4.2 Prueba de germinación y análisis de viabilidad con tetrazolio en semilla de *Calibanus hookerii*.**

### **4.2.1 Prueba de germinación.**

En el presente trabajo se identificaron los diferentes estadios de la germinación de *Calibanus hookerii*, siendo este estudio uno de los primeros en reportarlo junto con el realizado por Rojas-Piña *et al.* (2014). Las raíces pueden presentar crecimiento primario y secundario, el primero supone fundamentalmente crecimiento en longitud, mientras que el segundo es en grosor.

Durante la germinación de la semilla se pudo observar que la raíz es la primera estructura que brota del embrión, esta raíz inicial se denomina radícula (Ranal y García, 2006), algunas semillas a los tres días de ser colocadas en la cámara de germinación comenzaron a presentar radícula (**Figura 10. A**). Al respecto, en un estudio realizado por Serrano *et al.* (2000) en *Polianthes L.* (*Agavaceae*), género emparentado con *C. hookerii*, mencionan que la radícula emergió entre dos y cuatro días después de la siembra, resultados que concuerdan con los encontrados en este estudio; la forma que adopta el sistema radicular durante el crecimiento de la planta es diferente según el tipo de planta. Puede haber una raíz principal, originada directamente de la radícula, y unas ramificaciones laterales, este tipo de raíz es característica de las gimnospermas y dicotiledóneas, se denomina axonomorfa.

En el caso de las monocotiledóneas como *Calibanus hookerii*, este tipo de raíz es sustituido durante el desarrollo embrionario por raíces que se originan del tallo formando raíces adventicias; a los 9 días se observó la cofia y el inicio de la raíz primaria (**Figura 10. B**); la raíz crece inicialmente en longitud debido a la actividad del meristemo apical, el cual está protegido por la cofia o caliptra.

Las células resultantes de la actividad meristemática se organizan formando una estructura denominada primaria. Se dice entonces que la raíz está en crecimiento primario todas ellas de igual tamaño, formando un sistema radicular denominado fasciculado; a los 12 días se observó la presencia de pelos radicales, raíz primaria y el cotiledón inició su crecimiento y en la zona cercana al remanente seminal se curvó (**Figura 10. C**); a los 15 días se diferenció otra estructura que paulatinamente se fue ensanchando, al mismo tiempo se formó una abertura que según Tillich (1995) citado por Serrano *et al.*, (2000), constituye la vaina cotiledonar, en medio de esta estructura se diferenció la primera hoja verdadera, posteriormente suponemos que la vaina cotiledonar podría dar origen al caudex característico de *C. hookerii* (**Figura 10. D**); a los 17 días se observó un crecimiento de la raíz primaria y hoja primaria (**Figura 10. E**); a los 19 días apareció la hoja secundaria (**Figura 10. F**); y a los 22 días hubo un crecimiento de la plántula y la raíz (**Figura 10. G**); a los 25 días se observó un mayor crecimiento del vástago y la raíz de la plántula (**Figura 10. H**).



La poca profundidad de los sistemas fasciculados y la fuerza con que se sujetan al suelo hace a las monocotiledoneas especialmente convenientes para prevenir la erosión del suelo. A partir de los 22 días se consideró que la plántula podría sobrevivir por sí sola pues presentaba sus estructuras funcionales bien desarrolladas y ya no era dependiente de la semilla, por lo que esta semilla se denominó como restos, además el remanente de la semilla permaneció unido a la porción distal del cotiledón mucho tiempo después de que la primera hoja había aparecido (**Figura 10. G y H**).

En este estudio se observó que la germinación de *Calibanus hookerii* es rápida, esto podría deberse a que en su medio natural necesita de una ágil germinación debido a la escases de agua. La germinación se puede llevar a cabo después de la recolección de la semilla o después de permanecer almacenada. La semilla germina con o sin la cubierta del fruto.

La germinación de la semilla con testa fue 40% y sin testa fue 30%, en el **Cuadro 2** se muestran los resultados para la germinación de la semilla con testa y sin testa, siendo el mejor tratamiento sin testa, aunque probablemente los porcentajes se afectaron negativamente por problemas fitosanitarios, lo que impidió a las semillas expresar el potencial germinativo real, y que en este caso los principales problemas fitosanitarios, principalmente fueron causados por bacterias y hongos.

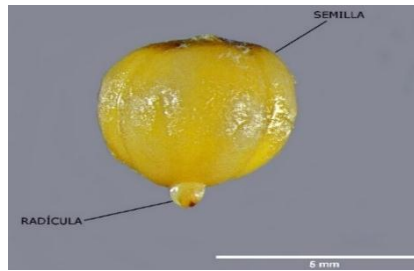
En la germinación *in vitro* se obtuvieron mayores tasas de germinación debido a que a las semillas se les dio un tratamiento previo para desinfectarlas antes de ser cultivadas en tubos con medio MS.

Con este ensayo nos damos cuenta que las tasas de germinación son bajas en comparación con lo reportado por Serrano *et al.*, (2000) para semillas de *Polianthes L.* (*Agavaceae*) reportan un promedio de 94-99% de germinación que es superior a lo encontrado en *Calibanus hookerii*.

**Cuadro 2.** Porcentaje de germinación de la semilla de *C. hookerii* con y sin testa.

Testa	Tiempo (Días)	Plántulas (%)		Semillas no germinadas (%)
		Normales	Anormales	
CON	10	15	0	85
	20	30	0	70
SIN	10	35	0	65
	20	40	0	60

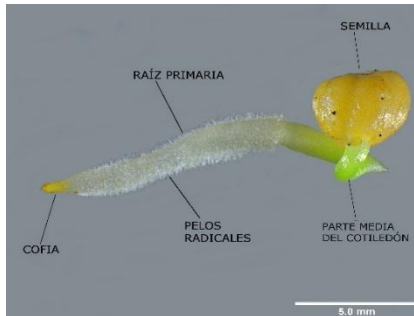
Los resultados muestran que la germinación en *Calibanus hookerii*, es de tipo hipógea. El cotiledón se curvan formando una estructura conocida como parte media del cotiledon, en estadios avanzados se llama cotiledón, este cotiledón permanece mucho tiempo uniendo el remanente de semilla con la plántula, además presenta una estructura llamada vaina cotiledonar de esta estructura se derivan las hojas y la raíz, posiblemente de origen al caudex característico de *C. hookerii*. Estos resultados son similares a los reportados por Serrano *et al.* (2000) para el género *Polianthes L.* (*Agavaceae*).



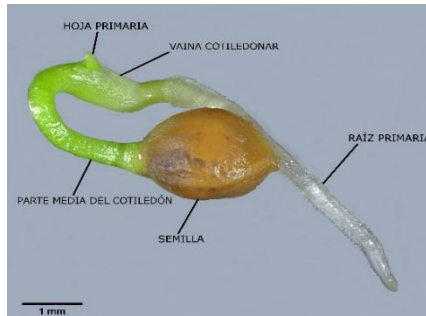
**A.** Germinación a los 6 días.



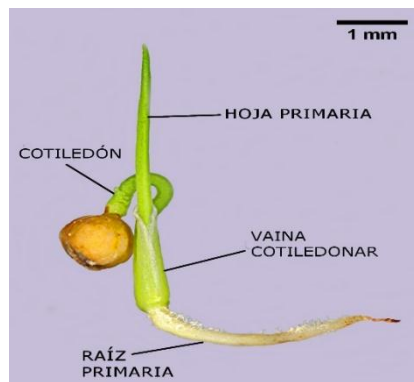
**B.** Germinación a los 9 días.



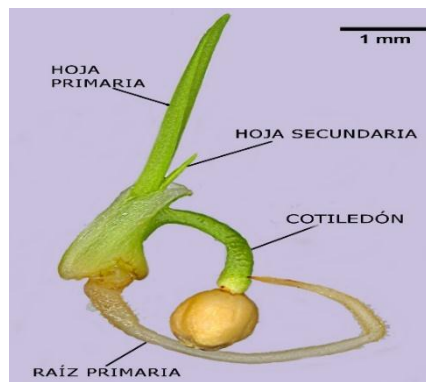
**C.** Germinación a los 12 días.



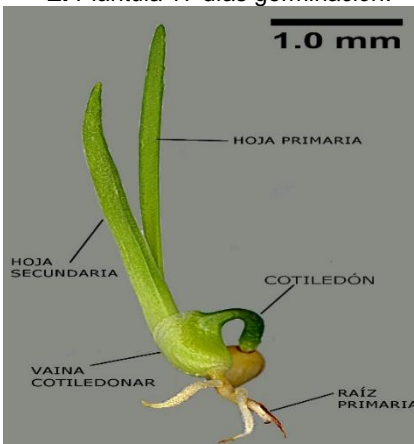
**D.** Germinación a los 15 días.



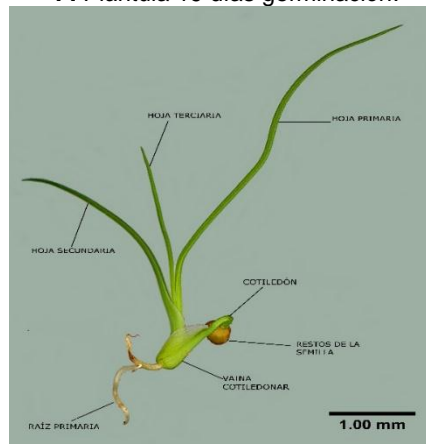
**E.** Plántula 17 días germinación.



**F.** Plántula 19 días germinación.



**G.** Plántula 22 días germinación.



**H.** Plántula 25 días germinación.

**Figura 10.** Estadios de la germinación de *Calibanus hookerii*. **A.** 6 días; **B.** 9 días; **C.** 12 días; **D.** 15 días; **E.** 17 días; **F.** 19 días; **G.** 22 días; **H.** 25 días.

#### 4.2.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio.

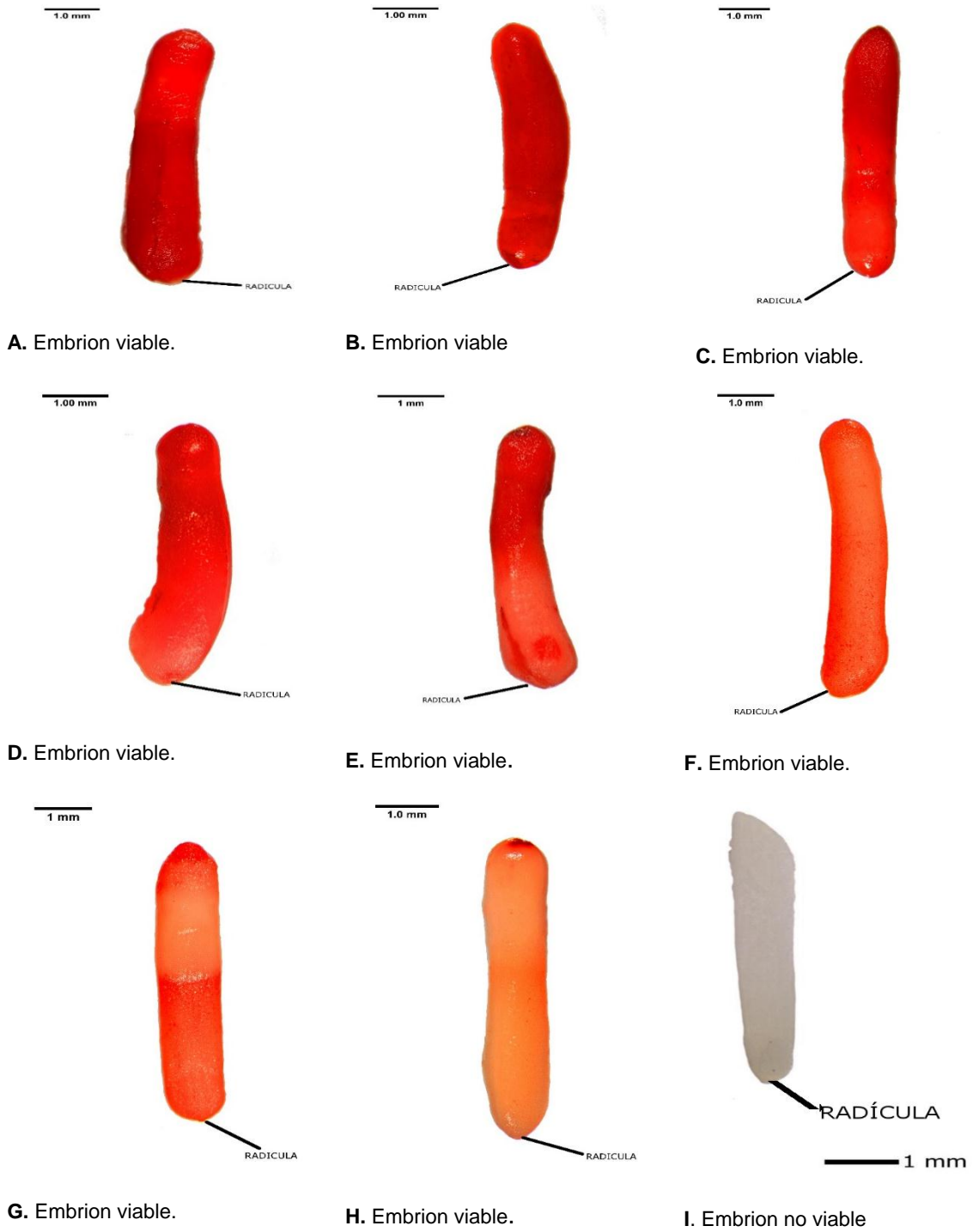
Con el objetivo de conocer la viabilidad de las semillas de *Calibanus hookerii* se realizó la prueba topográfica de tetrazolio. De acuerdo a la respuesta de los embriones al 2,3,5, cloruro de trifenil tetrazolio, con base al color que adquirieron se pudo determinar el grado de viabilidad de los embriones. Se clasificaron a todos los embriones que presentaron coloración rojo intenso en su totalidad y aquellos cuya coloración fue de un tono rosa como viables (**Figura 11. A - D**) y el color blanco se consideró no viable (**Figura 11. I**). Los colores intermedio se ubicaron como embriones que van perdiendo su viabilidad (**Figura 10. E - H**).

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que 86 % de viabilidad es un buen porcentaje de viabilidad (ISTA, 2010). Dicho porcentaje posteriormente se comparó con los resultados experimentales de germinación y se comprobó que esta cifra no correspondía al porcentaje obtenido en la prueba de viabilidad. El porcentaje de germinación obtenido fue de 40 % con testa y 30 % sin testa, estos resultados discrepan con lo señalado por Moreno (1996), en cuanto a que los resultados son muy semejantes a los esperados en la germinación. Con relación a la prueba de germinación *in vitro*, los resultados muestran porcentajes de germinación similares (60-97%) con respecto al porcentaje de viabilidad (86%), debido posiblemente al efecto de las condiciones de germinación (promotores químicos y factores físicos involucrados).

Las fracturas, la textura y las estructuras anormales de los embriones son importantes en el análisis, puesto que las semillas firmes, duras o aparentemente latentes reaccionan normalmente con la solución de tetrazolio y sin embargo, pueden o no ser viables, lo cual se establece analizando cuidadosamente que estructuras vitales del embrión se tiñen (radícula, epicótilo o hipocótilo). Con esta técnica también es posible determinar los grados de envejecimiento del tejido embrionario mediante la aparición de coloraciones en tonos pálidos o moteados.

El tamaño de las semillas también influye en los resultados, puesto que las semillas pequeñas requieren más cuidado en su manipulación, pudiendo incluso dañarse estructuras vitales y alterar los valores reales de viabilidad. Por el contrario, las semillas grandes son más fáciles de manejar y por lo tanto los resultados de dicha prueba son más fácilmente observables.

Finalmente, la trascendencia de la implementación y práctica de la prueba de viabilidad radica por un lado, en la relación con el cultivo de semillas de plantas ornamentales. La presencia y distribución en condiciones naturales de *C. hookerii* se ha visto altamente afectada, al grado que se encuentra en peligro de extinción, por lo que el conocimiento de los aspectos referentes biología esta especie nos ayudara en gran medida a desarrollar técnicas de propagación más prácticas y eficientes que nos permita cultivara y preservar a especie representativa del Norte de México.



**Figura 11.** Embriones viables e inviables. **A-D** embriones viables; **E-H** embriones que van perdiendo viabilidad; **I** embrión no viable.

En cuanto a las características de longitud y ancho del embrión, los resultados se muestran en el **Cuadro 3**. La longitud del embrión varió de 3.24 a 2.42 mm con un promedio de 2.74 mm. El ancho del embrión varió de 0.59 a 0.40 mm con un promedio de 0.48 mm. En un estudio similar, para semillas de *Beaucarnea hiriartiae* sp. N., reporta un embrión de 3 a 3.5 mm de largo y 0.7 a 0.9 mm de ancho (Hernandez, 1992). Estos resultados son similares a lo encontrado en este estudio para *Calibanus hookerii*.

**Cuadro 3.** Promedio de las dimensiones provenientes de la digitalización de imágenes de embriones de *Calibanus hookerii*.

Longitud (mm)		Ancho(mm)	
$\bar{X}$	C.V	$\bar{X}$	C.V
2.74	0.688	0.48	0.568

$\bar{X}$ =Promedio; C.V= Coeficiente de variación

Las dimensiones del embrión podría ser otra área de oportunidad en estudios futuros, para entender mejor el papel que desempeña el tamaño embrión en la fisiología de la planta.

### **4.3 Micropropagación de *Calibanus hookerii* a partir de semillas como explantes**

#### **4.3.1 Desinfección de la semilla**

No se reporta que alguna especie del género *Nolina* pueda ser producida *in vitro* sin algún tratamiento de esterilización.

En este estudio la presencia de hongos y bacterias fue un factor determinante para el establecimiento adecuado de un protocolo para la micropropagación de *C. hookerii*, ya que al inicio del experimento la contaminación de las plántulas y en algunos casos semillas era muy común, por consiguiente en algunos tratamientos completos (30 repeticiones por tratamiento) se contaminaron todas las muestras. Por lo que se tuvieron que ensayar diversos métodos de desinfección de la semilla para evitar que las semillas y las plántulas se contaminaran. Esto se logró combinando varios métodos de desinfección. El proceso de desinfección utilizado en este estudio ( Ver materiales y métodos) fue el más adecuado para la obtención de plántulas *in vitro* de *Calibanus hookerii* libres de contaminación y la obtención de porcentajes de germinación altos como en el caso de 97% con 5 mg.L de BA, observando que no se contaminaron las muestras hasta por 2 meses. Este proceso de desinfección se hizo con la intención de controlar la contaminación endógena por hongos principalmente que presentaron las semillas al inicio del establecimiento del cultivo *in vitro*.



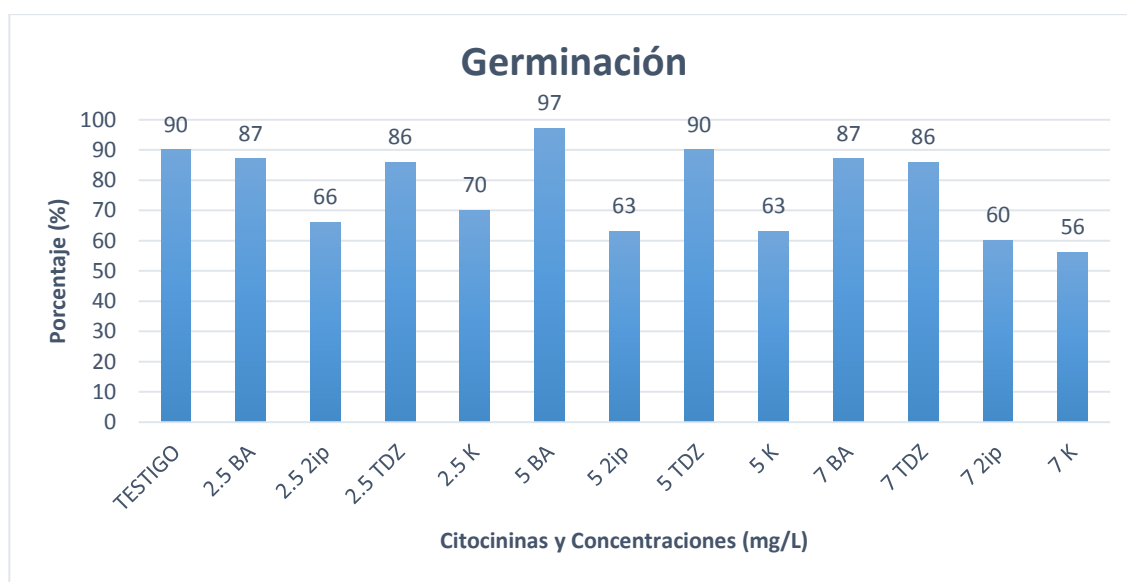
Reyes (2002) determinó que en *Nolina parviflora* al remojar las semillas en agua por 24 horas y colocarlas a temperaturas de 20 y 25 °C se obtendrán germinaciones del 87.5% y 85% respectivamente, ambos casos en ausencia de luz. En *Nolina recurvata* ocurrió la germinación cuando la semilla estuvo a una temperatura de 20 °C (Faucon, 2004); en caso de que las semillas fueran previamente sumergidas en agua caliente por cuatro horas y colocadas a 26 °C se obtuvo un 80% de germinación en el primer mes (Mário, 2003).

En géneros de la misma familia como *Yucca glauca* se ha determinado que sus tasas de germinación van desde 45 a 98 % pero generalmente el promedio es de 80 a 90% bajo condiciones de laboratorio (USDA Forest Service, 2004) siendo las temperaturas óptimas de 28 a 32 °C (UF, 2005); en *Yucca rostrata* si las semillas son agitadas por un día en agua y colocadas en bolsas ziploc con peat moss se obtendrá una germinación del 100% (Glavin, 2005).

Flores *et al.* (2008) reportan que no fue posible manejar la semilla sin la previa desinfección ya que existía la presencia de hongos. Cabe mencionar que se mantuvieron plántulas desarrolladas *in vitro* libre de contaminación por más de cuatro meses, sin la presencia de hongos por lo que el método de desinfección es una buena estrategia para la limpieza de la semilla. Los tratamientos de desinfección de semilla son factibles por aplicar en *Nolina parviflora* con una efectividad de hasta el 100 %, lo que permite disminuir las tasas de mortalidad de plántulas germinadas.

### 4.3.2 Germinación *in vitro*.

Las observaciones iniciaron a los siete días después de la siembra y la última fue a los 28 días. De un total de 30 repeticiones por tratamiento, la concentración 2.5 mg.L con BA y TDZ tuvo una germinación de 87 %, para el tratamiento con K se obtuvo una germinación de 70 %, mientras que la más baja se presentó en 2ip con 66 %. El testigo fue el de mejor germinación con 90 %. Para la concentración de 5 mg.L, el mejor tratamiento fue BA con 97% de germinación, incluso fue superior al testigo (90 %), seguido del tratamiento TDZ con 90 % de germinación y por último los tratamientos 2ip y K con 63 %. Para la concentración de 7 mg.L, el mejor tratamiento fue BA con 87 % de germinación, seguido del tratamiento con TDZ (86 %), por último los tratamientos 2ip (60 %) y K (56 %) de germinación. De las cuatro citocininas ensayadas la que obtuvo mejores resultados en cuanto a germinación fue BA (**Figura 12**).

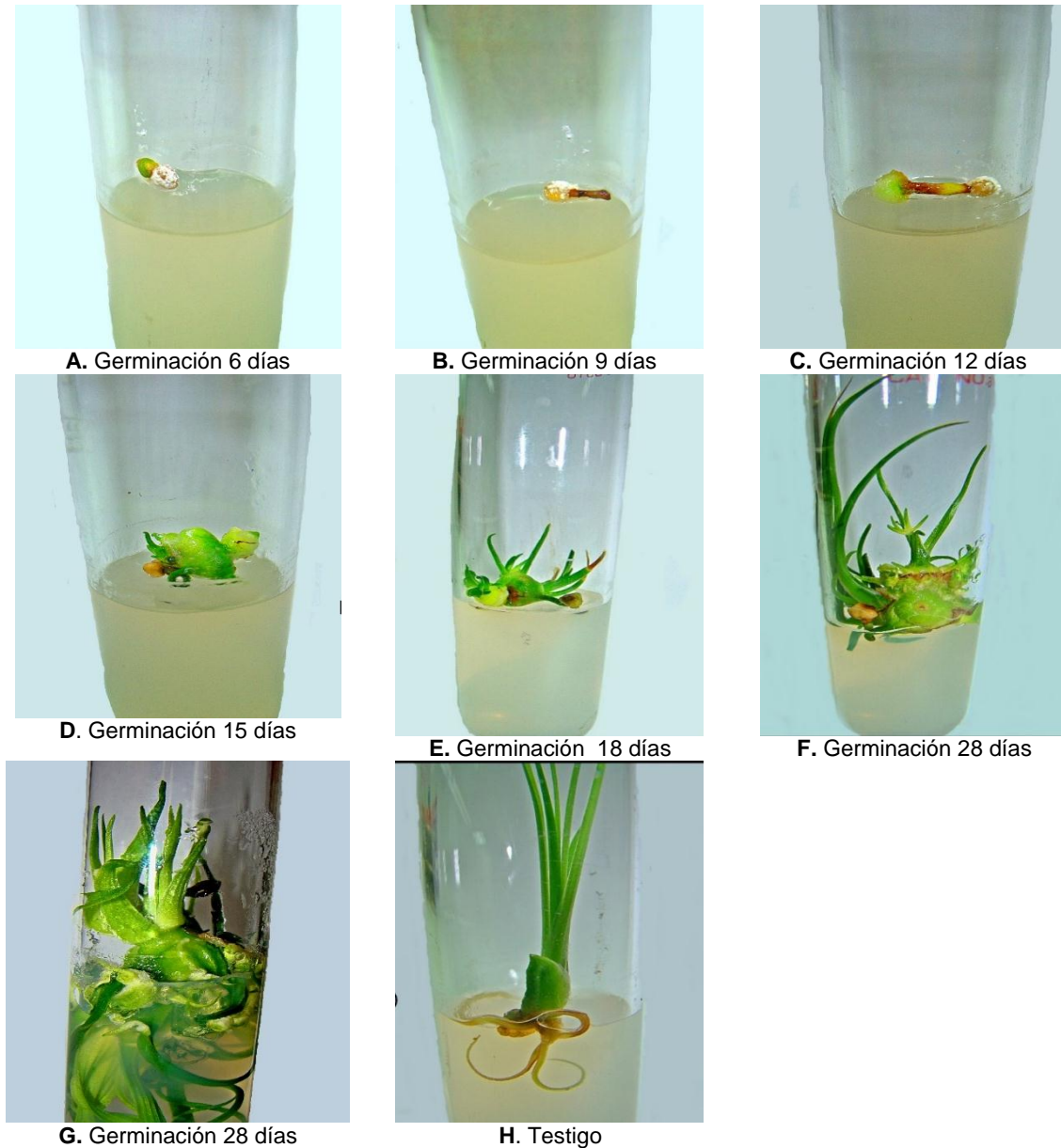


**Figura 12.** Porcentajes de germinación *in vitro* de semilla de *C. hookerii* con BA=6-Benciladenina; 2iP= 2-isopentil-adenina; TDZ= Thidiazuron; K= cinetina

En las **Figura 13** se muestra la secuencia de la germinación a partir del día 0 hasta 28 días. Del día 28 hasta el día 30, en la plántula, aparecieron brotes pequeños en todos los tratamientos, a estos brotes pequeños no se les midió la longitud. A los cuatro días inició la germinación de la semilla, pero a los 6 días comenzaron a aparecer los primeros brotes y el número de semillas germinadas aumentó, por esta razón se decidió comenzar a contar a partir del sexto día esto en todos los tratamientos (**Figura 13. A**), a los nueve días se observó que el número de semillas germinadas siguió aumentado y el primer brote comenzó a elongarse (**Figura 13. B**), a los doce días continuaron germinando más semillas y el desarrollo del primer brote (**Figura 13. C**), a los quince días nuevamente aumentó el número de semillas germinadas y el brote además de continuar su desarrollo comenzó a producir nuevos brotes (**Figura 13. D**), a los dieciocho días presentó más semillas germinadas y los brotes nuevos comenzaron a crecer (**Figura 13. E**), a los veintiocho días se alcanzó la máxima germinación de las semillas, y los primeros brotes, además de crecer comenzaron a generar nuevos brotes sobre las hojas ya desarrolladas (**Figura 13. F y G**), esto posiblemente se debe a que el uso de citocinas estimula la división celular de la planta para producir nuevos brotes, lo que en el testigo no se presentó (**Figura 13. H**).

La baja respuesta a la germinación estándar se asocia a fenómenos de dormancia seminal (Upadhyaya y Nigam, 1999) relacionados con: (i) la presencia de una cubierta (testa o endocarpo) lignificada, que actúa como una barrera mecánica en la

salida del embrión o en el intercambio hídrico y gaseoso (López-Granados y García-Torres, 1996; Barnett, 1997; Cardina y Sparrow, 1997; Bandyopadhyay *et al.*, 1999) (ii) equilibrios hormonales en el endospermo no favorables para el desarrollo del embrión ( Jinks y Ciccarese, 1997; Benech-Arnold *et al.*, 1999) y (iii) desfases entre el proceso de maduración del fruto y del embrión (Cheplick, 1992).



**Figura 13.** Germinación *in vitro* de la semilla de *Calibanus hookerii*. **A** 6 días; **B** 9 días; **C** 12 días; **D** 15 días; **E** 18 días; **F** 28 días; **G** 28 días; **H** testigo.

Para disminuir la dormancia seminal y con ello favorecer la germinación, algunos autores como Broschat (1998) han utilizado la semilla sin cubierta tanto en semillero como en cultivo *in vitro*. Otros autores como Acebedo *et al.* (1997); Matthys-Rochon *et al.* (1998); Cantos *et al.* (1998), obtuvieron aun mejores resultados por germinación *in vitro* del embrión aislado. En todos los casos, el cultivo *in vitro* se mostró como un método muy eficaz para mejorar la respuesta a la germinación, tanto por el incremento del porcentaje de plántulas obtenidas como por la disminución del tiempo necesario para germinar.

Guillén *et al.* (2015) reporta que después de 30 días de haber sembrado las semillas de *Beaucarnea inermis*, se registró 92 % de germinación, y se produjeron plántulas que a los 90 días se caracterizaron por la presencia de raíces y de 4 a 6 hojas.

También bajo condiciones *in vitro* otros autores han registrado resultados similares en porcentaje de germinación (89 %) para *B. gracilis* y *B. recurvata* (Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005; Reyes *et al.*, 2013). Por otro lado, en un estudio de germinación *in vivo* realizado en *B. gracilis*, el porcentaje más alto registrado fue de 74 % (Flores y Briones, 2001). Los altos porcentajes de germinación observados *in vitro* podrían ser el resultado del suministro en cantidades óptimas y constantes de los factores ambientales más importantes en el proceso de germinación, como la humedad, temperatura, fotoperiodo, intensidad luminosa y nutrimentos (Baskin y Baskin, 1998). Una de las ventajas más importantes de las técnicas de cultivo *in vitro* es el control sobre los factores externos que determinan diferentes procesos fisiológicos.

Golubov *et al.* (2007) reportaron porcentajes mayores al 80% de germinación *in vitro* en semillas de *B. recurvata* que permanecieron almacenadas durante seis años en condiciones de baja temperatura (6 °C) y baja humedad relativa (en deshidratación con sílica gel).

Reyes *et al.* (2013) reportan que la germinación *in vitro* de las semillas comenzó a observarse a los ocho días, y el proceso terminó a los 28. Las mayores tasas de germinación se observaron en *Beaucarnea gracilis* y *Dasyllirion leiophyllum*, con 96 y 95 %, respectivamente. *Dasyllirion serratifolium* mostró la menor tasa (22 %). Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) reportan tasas de germinación *in vitro* de 89 y 95 % para *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata*.

Vadillo (2012) reporta que las semillas de *Beaucarnea purpusii* y *B. compacta* tuvieron porcentajes de germinación *in vitro* mayor al 90 % en medio de cultivo MS semi-sólido.

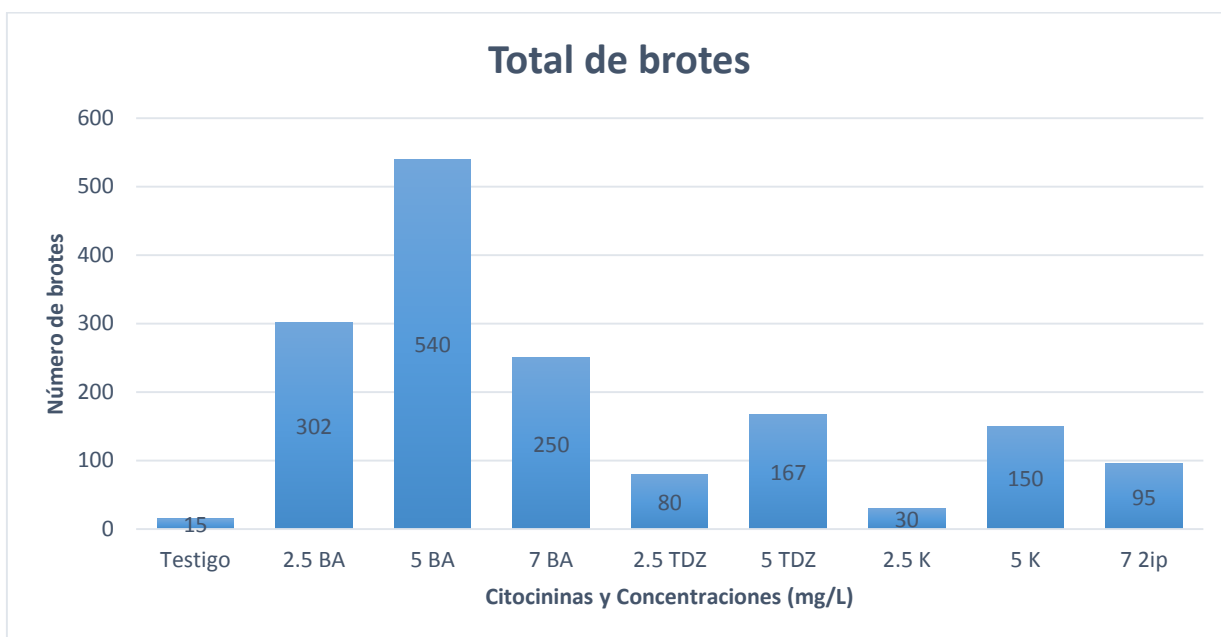
Para *Calibanus hookerii* se reportaron resultados similares a lo descrito por los autores anteriores, obteniendo un 56 % de germinación *in vitro* en el tratamiento con cinetina que fue el más bajo de todos los tratamientos ensayados, y un 97 % para el caso BA que fue el mejor tratamiento. Por último en todos los tratamientos ensayados no se encontró oxidación de los explantes. Parece ser que este género de plantas responden bien a las condiciones presentes en el cultivo *in vitro*, por lo cual es una opción para su propagación masiva con fines comerciales o de conservación.

### 4.3.3 Número y longitud de brotes.

Las citocininas influyen sobre el desarrollo y fisiología de los vegetales, incluyendo germinación de semillas, control de la dominancia apical, interacción planta-patógeno, desarrollo de flores y frutos y senescencia de hojas, entre otros (Shimizu y Mori, 2001). Estos procesos también son influenciados por otros estímulos como la luz y otros fitorreguladores, los resultados fisiológicos y de desarrollo reflejan respuestas altamente dependientes de tales estímulos (Shimizu y Mori, 2001; Haberer y Kieber, 2002). En este estudio se utilizaron sólo citocininas para inducir la producción de brotes en explantes basales. No todos los tratamientos fueron capaces de inducir la generación de brotes múltiples en la especie estudiada (**Figura 14**).

A los 7 días de que inició la germinación, se observó la presencia de contaminación por hongos y bacterias, además pasados 30 días algunas plántulas dejaron de crecer, y ya no continuaron su desarrollo. Por lo que del número de muestras inicial (30), sólo quedaron 15 por tratamiento. En algunos casos la falta de desarrollo de las plántulas impidió el conteo de brotes por lo que se excluyeron algunos tratamientos. Mientras que para los tratamientos restantes se encontraron los siguientes resultado: para la concentración 2.5 mg.L con BA, se contaron un total de 302 brotes (**Figura 14**), con un promedio de 18 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. A**), en la concentración con 2.5 mg.L TDZ se obtuvieron un total de 80 brotes (**Figura 14**), con un promedio de 5 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. B**), por último para la concentración con 2.5 mg.L K se lograron un total de 30 brotes (**Figura 14**) y un

promedio de 2 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. C**), todos los tratamientos fueron superiores al testigo, siendo el mejor el tratamiento con BA. En la concentración 5 mg.L con BA, se alcanzo un total de 540 brotes (**Figura 14**) con un promedio de 26 brotes (**Cuadro 6; Figura 15. D**) por semilla, en la concentración con 5 mg.L TDZ se obtuvo un total de 167 brotes (**Figura 14**) y un promedio de 11 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. E**). Por ultimo para la concentración con 5 mg.L K se encontraron un total de 122 brotes (**Figura 14**), con un promedio de 8 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. F**). En la concentración 7 mg.L con BA, se obtuvo un total de 208 brotes (**Figura 14**) con un promedio de 14 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figuras 15. G**), en la concentración con 7 mg.L 2ip se contaron un total de 96 brotes (**Figura 14**), con un promedio de 6 brotes por semilla (**Cuadro 6; Figura 15. H**)., todos los tratamientos fueron superiores al testigo (**Cuadro 6; Figura 15. I**), siendo el mejor el tratamiento con BA.



**Figura 14.** Número de brotes totales y citocininas. BA=6-Benciladenina; 2iP= 2-isopentil-adenina; TDZ=Tidhiazuron; K= cinetina.





A. Tratamiento 2.5 mg.L con BA



B. Tratamiento 2.5 mg.L con K



C. Tratamiento 2.5 mg.L con TDZ.



D. Tratamiento 5 mg.L con BA



E. Tratamiento 5 mg.L con K



F. Tratamiento 5 mg.L con TDZ



G. Tratamiento 7 mg.L con 2ip.



H. Tratamiento 7 mg.L con BA



I. Testigo

**Figura 15.** Respuesta de la semilla de *C. hookerii* a los tratamientos con diferentes citocininas.

En el **Cuadro 4** se presenta el análisis de varianza para la variable longitud de brotes donde se observa diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el comportamiento de las diferentes hormonas para la variable evaluada. Los coeficientes de variación en todas las variables son aceptables.

**Cuadro 4.** Cuadrados medios y significancia estadística de la variable longitud de brotes en semillas de *C. hookerii*.

FV	GL	2.5 BA	5 BA	7 BA	2.5 K	5 K	2.5 TDZ	5 TDZ	7 2ip
<b>Longitud Brotes</b>	6	5.590*	89.54*	6.310*	53.43*	151.18 <sup>ns</sup>	0.337*	11.908*	36.634*
<b>Error</b>	53	3.218	4.449	1.104	7.425	16.37	1.002	0.545	14.295
<b>C.V</b>		0.63	0.45	0.39	0.71	0.99	0.44	0.28	0.53

FV=Fuente de variación; GL=Grados de libertad; C.V= Coeficiente de variación; BA=6-Benciladenina; 2iP= 2-isopentil-adenina; TDZ= Thidiazuron; K= cinetina; \* = significativo al 0.05, ns= no significativo.

En el **Cuadro 5** se presenta el análisis de varianza para la variable número de brotes donde se observa diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el comportamiento de las diferentes hormonas para la variable evaluada. Los coeficientes de variación en todas las variables fueron aceptables.

**Cuadro 5.** Cuadrados medios y significancia estadística de la variable número de brotes en semillas de *C. hookerii*.

FV	GL	2.5 BA	5 BA	7 BA	2.5 K	5 K	2.5 TDZ	5 TDZ	7 2ip
<b>Número Brotes</b>	6	17.39*	23.06*	8.89*	0.25*	5.39*	10.50*	32.06*	8.25*
<b>Error</b>	9	27.11	38.06	13.06	2.25	9.89	10.88	4.17	2.47
<b>C.V</b>		0.29	0.23	0.25	0.71	0.37	0.57	0.17	0.23

FV=Fuente de variación; GL=Grados de libertad; C.V= Coeficiente de variación; BA=6-Benciladenina; 2iP= 2-isopentil-adenina; TDZ= Thidiazuron; K= cinetina; \* = significativo al 0.05, ns= no significativo.

En longitud del brote el mejor tratamiento fue el de la concentración 7 mg.L con 2ip ya que se obtuvo un promedio de 7.15 cm, seguido por los tratamientos 2.5 mg.L K

(5.59 cm), 5 mg.L BA (5.10 cm) y 5 mg.L K (5.33 cm) estos tres tratamientos estadísticamente son iguales, por último los tratamientos con 2.5 mg.L BA (3.03 cm), 7 mg.L BA (2.71 cm), 2.5 mg.L TDZ (2.23 cm) y 5 mg.L TDZ (2.65 cm), de estos tratamientos la concentración 2.5 mg.L BA fue el mejor, ninguno de los tratamientos supero al testigo con 8.07 cm en promedio (**Cuadro 6**). Cabe mencionar que la concentración 7 mg.L con Zip fue la única de todas las ensayadas donde se observo una respuesta similar al testigo en cuestión de la longitud de los brotes.

**Cuadro 6.** Comparación de medias para los diferentes tratamientos con citocininas en semilla de *C. hookerii*.

Brotes	Testigo	2.5mg.L BA	5mg.L BA	7mg.L BA	2.5mg.L K	5mg.L K	2.5mg.L TDZ	5mg.L TDZ	7mg.L Zip
Número	1	18.067b	26a	13.86cb	2f	8.13ed	5.33ef	11.13cd	6.40edf
Longitud (cm)	8.07a	3.03d	5.10 c	2.71d	5.89bc	5.33bc	2.23d	2.65d	7.15ba

Valores con la misma letra dentro de cada hilera son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Castañeda y Santacruz (2008) trabajaron con *Beaucarnea recurvata* L, obtuvieron al trascurrir 65 días del establecimiento de los explantes y al adicionar el regulador de crecimiento BA se favoreció la proliferación de yemas axilares, siendo estadísticamente iguales 2.5 mg.L, 5 mg.L y 7.5 mg.L. Demostraron que cualquiera de estas dosis puede estimular la proliferación de yemas axilares de los explantes, la dosis que presenta un promedio más alto en la producción de brotes (10.93 brotes por explante) es la de 5 mg.L, coincidieron con lo reportado por Osorio y Mata-Rosas (2005) quienes utilizaron estas dosis para la proliferación de yemas axilares de *B. gracilis*. Estos mismos resultados difieren a lo reportado por Espinosa *et al.* (2006) quienes adicionaron 2 mg.L BA y 1 mg.L ANA y se obtuvo formación de brotes y callo solo en la parte basal.

Guillén *et al.* (2015) reportaron para *Beaucarnea inermis*, mediante organogénesis y embriogénesis somática, la formación de brotes adventicios en el segmento basal de hoja entre tratamientos fue significativo. Los valores más altos (2.7 y 2.8 brotes por explante) se registraron con 2 mg /L de BA + 0.5 mg.L de ANA y en 6 mg.L de BA + 0.5 mg.L de ANA. La mayor respuesta de formación de brotes adventicios (5.7 brotes por ápice), se presentó cuando el medio contenía 2 mg.L de BA; esta concentración de fitohormona también favoreció la mayor inducción de callo. Los cultivos de callo para la formación de brotes adventicios fue significativo, se registraron hasta 3 brotes por segmento de callo cuando el medio contenía 2 mg.L de BA.

Reyes *et al.* (2013) en un estudio sobre propagación *in vitro* de *nolináceas* mexicanas reporta que la mejor respuesta se obtuvo con 3 mg.L de BA para *Dasyllirion leiophyllum*, donde se produjeron en promedio más de 10 brotes por explante. La menor respuesta se observó en *Beaucarnea goldmanii*, que en su mejor tratamiento generó casi cuatro brotes por explante (BA). En todas las especies, los explantes colocados en un medio sin citocininas (testigo) no generaron nuevos brotes.

Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) probaron el efecto de varias concentraciones de BA en la generación de brotes en explantes basales de *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata*. Para la primera, el mejor tratamiento fue con 5 mg.L de BA con una producción de 5.4 brotes por explante, mientras que para la segunda fue 3 mg.L de BA con 1.9 brotes por explante.

Vadillo (2012), encontró que el tratamiento más efectivo para la propagación de *Beaucarnea compacta* fue el medio de cultivo semi-sólido adicionado con 5 mg.L de BA. En este tratamiento los explantes formaron en promedio 23.6 brotes normales como respuesta.

En *Yucca valida*, se recomienda el uso de citocininas combinadas con auxinas para generar brotes *in vitro*. En este caso, la mayor eficiencia es de 5.2 brotes por explante basal en un tratamiento con 4.5 mg.L de BA y 0.87 mg.L de ácido indolacético (AIA) (Arce-Montoya *et al.*, 2006). En cuanto al tipo de citocinina, en las especies del género *Beaucarnea*, las mejores respuestas se observaron siempre en los tratamientos con BA.

En el presente estudio se encontraron respuestas similares a las mencionadas por diversos autores para este género de plantas, además coincidimos en que las mejores respuestas se observaron siempre en los tratamientos con BA, obteniendo para la concentración 2.5 mg.L (18) brotes por semilla, similar a lo reportado por Reyes *et al.* (2013) para *Dasyllirion leiophyllum* y superior a lo reportado por Guillén *et al.* (2015) en *Beaucarnea inermis*, quienes utilizaron concentraciones similares. En la concentración con 5 mg.L se obtuvo un promedio de 26 brotes por semilla, este resultado fue similar a lo reportado por Vadillo (2012), quien indica que el tratamiento más efectivo para la propagación de *Beaucarnea compacta* fue la concentración con 5 mg.L de BA, con 24 brotes como respuesta, y superior a lo reportado por los demás autores para la misma concentración.

Para la concentración 7 mg.L obtuvimos un promedio de 14 brotes por semilla, el cual fue superior a lo encontrado por Castañeda y Santacruz (2008), quienes reportan para *Beaucarnea recurvata* L, a una concentración de 7.5 mg.L un promedio de 5.8166 brotes por explante, mientras que Guillén *et al.* (2015), encontraron que a una concentración de 6 mg/ Lde BA + 0.5 mg.L de ANA para la inducción de brotes en hoja produce 2.8 brotes en promedio. En las observaciones cualitativas todas las concentraciones de estos tratamiento no presentaron la formación de raíz, parece ser que inhiben el desarrollo de raíces como lo reporta Vázquez (2001).

Reyes *et al.* (2013), observaron diferencias cualitativas entre las citocininas empleadas y con las concentraciones probadas de BA , esta última genera en la mayoría de las especies un número más alto de brotes, pero las hojas de éstos muestran una talla menor. Nosotros observamos lo mismo que Reyes, el tratamiento con BA fue el mejor en cuanto a la producción del número de brotes a todas las concentraciones, pero estos brotes mostraron una talla menor o igual con respecto a los otros tratamientos ensayados en este estudio.

Por el contrario, 2iP generó un menor número de brotes, pero estos alcanzan tallas mayores debido al desarrollo de las hojas. De las concentraciones ensayadas para 2ip en este estudio, la única que presentó una respuesta fue la de 7mg.L, la cual se observó que el número de brotes por semilla fue de los más bajos, dato similar al encontrado por Reyes (2013), pero en relación con la longitud del brote, este fue

el mejor tratamiento ya que presentó mayor talla del brote, similar al testigo, esto concuerda con lo indicado por el autor antes mencionado. Las concentraciones de 2.5 y 5 mg.L, comparadas con el testigo no presentaron diferencias significativas para número y talla de brotes por semilla. Espinosa *et al.* (2006) ensayaron diversas concentraciones en *Beaucarnea gracilis* con 2,4-D, el cual no presentó significancia a ninguna dosis.

Por su parte, TDZ, que es una citocinina sintética de alta actividad, usada sobre todo en especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993), genera brotes con hojas curvas y deformes, y en menor cantidad con respecto a BA y 2ip (Reyes et al., 2013). Esto quiere decir que este compuesto tiene efectos no deseables en las especies de nolináceas.

Vadillo (2012) estudió el efecto de TDZ y BA en *Beaucarnea compacta* y *Beaucarnea purpusii* encontrando que el tratamiento más efectivo para la propagación de *Beaucarnea purpusii* fue el medio de cultivo semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y con 0.1 mg.L de TDZ. En este tratamiento los explantes formaron en promedio 40.21 brotes normales como respuesta. Para *Calibanus hookerii*, nosotros encontramos que con una concentración de 2.5 mg.L de TDZ se obtuvo un promedio de 5 brotes por explante con una longitud de 2.23 cm, estos resultados fueron de los más bajos de todos los tratamientos ensayados. Para la concentración de 5 mg.L con TDZ se encontró que el promedio de brotes por semilla fue 11 con una longitud de 2.65 cm en promedio, aunque no se obtuvo un gran número de brotes por semilla

como lo reportado por Vadillo (2012), para *Beaucarnea purpusii*, este tratamiento fue de los más altos en relación al número de brotes por semilla de todos los tratamientos ensayados, pero en lo que respecta a la longitud del brote fue de los tratamientos más bajos.

Se observó en las concentraciones 2.5 y 5 mg.L con TDZ, la inducción de la formación del caudex, característico de esta especie y la formación de raíz que no se observó en los demás tratamientos. El tratamiento con 7 mg.L no generó ningún resultado, solo se observó que la plántula se empezó a deformar posterior a la germinación.

En algunas especies de *Agave* se ha visto que el TDZ resulta más eficiente para la generación de brotes respecto a otras citocininas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Estos efectos diferentes de las citocininas probadas pueden estar relacionados con el hecho de que si bien a todos estos compuestos se les clasifica dentro de este grupo por su actividad fisiológica; su naturaleza química y origen es diferente. BA es una citocinina aromática sintética. 2iP es una citocinina natural de origen isoprenoide y TDZ es una citocinina sintética cuya naturaleza química es una fenilurea que fue descrita inicialmente como un herbicida defoliante (Lu, 1993; Strnad, 1997).

Choreño (1992) encontró que la adición de benciladenina en dosis de 0.1mg.L combinada con 0.1mg.L de ácido indolacético al medio MS, favorece mejores



elongaciones del brote principal en plántulas de sotol. Gastelum (1996), la auxina ácido indolbutírico en dosis de 3 mg.L también ha proporcionado un buen desarrollo de raíces (longitud y número) en plántulas de sotol crecidas *in vitro*; mientras que las citocininas benciladenina y kinetina inhiben el desarrollo de raíces (Vázquez, 2001).

Para el caso de *Calibanus hookerii*, al adicionar cinetina al medio MS, a una concentración de 2.5 mg.L se observó que el número de brotes en promedio fue de 2 brotes por semilla con una longitud de 5.89 cm, esta concentración fue la más baja en cuanto a la producción de brotes por semilla, pero fue una de las más altas en cuanto a la talla del brote. En la concentración con 5 mg.L se contó un promedio de 8 brotes por semilla, que es un promedio intermedio comparado con los demás tratamientos y la longitud también fue una de las más altas con respecto a los demás tratamientos. En las observaciones cualitativas todas las concentraciones de este tratamiento no presentaron la formación de raíz, parece ser que inhiben el desarrollo de raíces como lo reportado por Vázquez (2001).

## V. CONCLUSIONES

- 1) Las características morfológicas en estas especies se pueden utilizar como información para la clasificación de esta especie.
- 2) El tamaño del embrión de la semilla de *C. hookerii* es de menos de  $\frac{1}{4}$  con respecto al tamaño de la semilla, la longitud del embrión es de 2.74 mm, y el ancho es de 0.48 mm.
- 3) La semilla de *C. hookerii* presenta un contenido de humedad de 6%. El bajo contenido de humedad permite asegurar su calidad en términos de germinación, vigor y sanidad durante el almacenamiento.
- 4) El peso de mil semillas y el peso volumétrico son métodos seguros que podrán determinar la calidad física de la semilla y así poder obtener pruebas confiables y estandarizadas, para investigaciones futuras.
- 5) El tetrazolio a una concentración de 0,1% fue la mejor para teñir los embriones de *C. hookerii*., con lo cual se obtuvo una viabilidad de 86%.
- 6) El mejor porcentaje de germinación de la semilla de *C. hookerii* se obtuvo cuando se elimina la testa.
- 7) La germinación *in vitro* de la semilla de *C. hookerii* fue alta en todos los tratamientos.
- 8) El método de desinfección fue el adecuado para obtener semillas libres de patógenos y es una opción para controlar la contaminación endógena de semillas.
- 9) El mejor tratamiento fue con benciladenina (BA), para todas las concentraciones 2.5, 5 y 7 mg.L. Esta citocinina fue la que indujo el mayor número de brotes en la especie trabajada al estimular la división celular.
- 10) El tratamiento con 2-isopentil-adenina (2ip), en las concentraciones 2.5, 5 mg.L no indujeron la formación de brotes, mientras que con 7 mg.L se obtuvo el menor número de brotes de todos los tratamientos ensayados.
- 11) El uso de la técnica *in vitro* es una herramienta importante para estudiar y mantener germoplasma. También es un método que puede ayudar a producir mayor número de plantas para satisfacer los mercados o con fines de conservación.

## VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Acebedo, M.M.;** Liñán, J.; Lavee, S. y Troncoso, A. 1997. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae* 69. Pp 207-215.
- Andrade B. J. H. 1992.** Mejoramiento del vigor en semillas de maíz y su relación con la emergencia y rendimiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo. 98p.
- AOSA. 2002.** Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysts. New Mexico 8800.
- APG [Angiosperm Phylogeny Group].** 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85:531-553.
- APG II.** 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436.
- APG III.** 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- Arce-Montoya, M;** Rodríguez-Álvarez, M; Hernández-González, J; Robert, M. L. 2006. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant Cell Reports*. 25: 777-783.
- Bandyopadhyay. A;** Nautiyal. P.C; Radhakrishnan. T y Gor .H. K. 1999. Role of testa, cotyledons and embryonic axis in seed dormancy of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Jagron crops* 182 (1): 37-41.
- Barnett J.P.** 1997. Relating pine seed coat characteristics to speed of germination, geographic variation, and seedling development. *Tree plant notes*. Washington, D.C: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Winter/Spring 48 (1/2): 38-42.
- Baskin C.C. y Baskin J.M.** 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.

- Benech-Arnold R.L;** Giallorenzi M.C; Frank J y Rodriguez. V. 1999. Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Science*. Wallingford, Oxon, UK : C.A.B. International. 9 (1): 39-47.
- Bishaw Z., Niane A. A., Gan Y.** 2007. Quality Seed Production. *In: Lentil, an ancient Crop for Modern Times* S. S. Yadav (Ed). Springer. Holanda. Pp. 349-383.
- Bogler D.** 1998. *Nolinaceae*. *In: The Families and Genera of Vascular Plants*. Kubitzki K. (Ed). Volume III: Flowering Plants Monocotyledons: *Lilianae* (except *Orchidiaceae*), Springer-Verlag, Berlín, Pp. 392-396.
- Broschat T.K.** 1998. Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (*pindo palm*) seed germination. *HortTechnology*. American Society for Horticultural Science, 8 (4): 586-587.
- Brummitt R.K.** 1992. *Vascular Plant Families and Genera*. Royal Botanic Gardens, Kew. p.180.
- Bustamante, L. A. De León G. R.** 1993. Taller demostrativo de pruebas de viabilidad y vigor en semillas. VII curso de actualización de tecnología de semillas. Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de semillas. Universidad Agraria Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Bustamante L.** 1983. Semillas. Control y evaluación de su calidad. *In: Memorias del curso de actualización sobre tecnología de semillas*. Universidad Autónoma Antonio Narro. AMSAC. México. Pp. 99-106.
- Calva, C. G;** Pérez V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales. Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6 (11): 1 – 16.
- Cantos, M;** Cuervas, J.; Zarate, R y Troncoso, A. 1998. Embryo rescue and development of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*. *Seed Science and Technology*, 26:193-198.
- Cardel Y., V. Rico-Gray, J. G. García-Franco y L. B. Thien.** 1997. Ecological status of *Beaucarnea gracilis*, an endemic species of the semiarid Tehuacán Valley, México. *Society for Conservation Biology* 11:367-374.

- Cardina J. y Sparrow D. H.** 1997. Temporal changes in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seed dormancy. Weed-sci. Lawrence, KS : Weed Science Society of America. 45 (1): 61- 66.
- Castañeda S. M. C., Cándido, L. C., Colinas D. M. T., Molina M. J. y Hernández L. A.** 2009. Rendimiento y calidad de la semilla de cebada y trigo en campo e invernadero. Revista Interciencia. 34 (4): 286-292.
- 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. ISBN: 978-607-00-2083-4.
- Copeland, L. O y M. B. McDonald.** 2004. Seed vigor and vigor testing. *In: Principles of seed Science and Technology.* 4th. Ed. Kluwer Academic Publishers. USA.. Pp: 165-185.
- Corbineau F.** 2012. Marks of seed quality: from present to future. Seed Science Research. 22: S61-S68.
- Cronquist A.** 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, Nueva York.
- Cheplick G.P.** 1992. Sibling competition in plants. J-Ecol. Oxford : Blackwell Scientific. 1992. 80 (3): 567-575.
- Choreño P. C. P.** 1992. Factibilidad de la propagación *in vitro* de sotol (*Dasyllirion wheeleri S*). Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, UACH. Delicias, Chihuahua, p. 15.
- Domínguez Rosales M. S;** Alpuche Solís A. G.; Vasco Méndez N. L y Pérez Molphe Balch E. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 31 (4): 317 – 322.
- Doria J. 2010.** Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Cultivos tropicales. 31 (1): 74-85.
- Engler A.** 1888. *Liliaceae.* *In: Engler A. y Prantl. K. (Ed). Die Natürlichen Pflanzenfamilien T2, Ab5, Verlag, Leipzig, Pp. 10-91.*
- Espinosa G. A;** Aguirre E; Monsalvo A y Campos J.E. 2006. Estudios de conservación *ex situ* de *Beaucarnea gracilis* del Valle de Zapotitlán, Puebla,

a través de pruebas de viabilidad y senescencia experimental. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Guanajuato.

**FAO.** 2011. FAOSTAT. Food and agricultura Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>. Consultado el 10 Mayo del 2017.

**FAO.** 1985. Procedimiento de semillas de cereales y leguminosas de grano; directrices técnicas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Roma. Pp. 19-21.

**Faucon P.** 2004. *Ponytail Palm (Beaucarnea recurvata)*. [http://www.desert-tropicals.com/Plants/Agavaceae/Beaucarnea\\_recurvata.html](http://www.desert-tropicals.com/Plants/Agavaceae/Beaucarnea_recurvata.html). Consultada el 29 septiembre 2017.

**Flores García A;** Álvarez Moctezuma J. G; Rodríguez de la O J. L; Corona Ambris A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *nolina parviflora* (H.B.K) Hems. Foresta veracruzana,10 (2):27-33.

**Flores J. y Briones O.** 2001. Plant life form and germination in a Mexican inter tropical desert: effects of soil water potential and temperature. Journal of Arid Environments 47:485-497.

**García D. S. G. y Estrada G. A.** 1999. Caracterización de frijol de la variedad Bayomex mediante descriptores agronómicos y análisis de imágenes de morfología de semillas. Revista Fitotecnia Mexicana 22: 63-74.

**Gastelum J. R.** 1996. Micropropagación de sotol (*Dasyilirion wheeleri* S). Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, UACH. Delicias, Chihuahua.

**Gioanetto, F. y Franco J.E.** 2004. Usos medicinales y etnobotánicos de las *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México y Centroamérica. *In:* Simposio Internacional sobre *Agavaceae* y *Nolinaceae*. Mérida, Yucatán. 2004. <http://www.cicy.mx/eventos/agaves/resumen.pdf>. Pp 6-7.

**Glavin F.** 2005. *Yucca rostrata*. *In:* rarepalms.com. <http://www.rarepalmseeds.com/pix/YucRos.shtml>. Consultada el 27 octubre 2016.

**Golubov J.;** Mandujano M.C; Arizaga S; Martínez-Palacios A. y Koleff P. 2007. Inventarios y conservación de *Agavaceae* y *Nolinaceae*. *In:* Colunga-García

M.P., Larqué S.A., Eguiarte L.E. y Zizumbo-Villareal D. (Eds). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto Nacional de Ecología, México, D.F, Pp. 133-152.

**Guillén S;** Martínez-Palacios A y Martínez H y Martínez-Ávalos J. G. 2015. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (*asparagaceae*), una especie amenazada del noreste de México Botanical Sciences 93 (2): 1-10.

**Haberer G. y Kieber J.J.** 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128, 354-362.

**Hampton, J. G.** Conductivity test. In: SEED VIGOUR TESTING SEMINAR. 1995. Copenhagen. [ Proceedings...] Zurich: International Seed Testing association. p.10-28.

**Hernandez S. L.** 1992. Una especie nueva de *Beaucarnea* (*Nolinaceae*). Acta Botánica Mexicana, Instituto de Ecología, A.C. Pátzcuaro, México, núm. 18, junio 1992, Pp. 25-29.

**Hernández, S.L. y Zamudio, S.** 2003. Two new remarkable *Nolinaceae* from central Mexico. Brittonia 55: 226–232. [http://dx.doi.org/10.1663/0007-196X\(2003\)055\[0226:TNRNFC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1663/0007-196X(2003)055[0226:TNRNFC]2.0.CO;2).

**Huetteman C A y Preece J.E.** 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33:105-119.

**Hutchinson J.** 1934. The Families of Flowering Plants. Vol II. Monocotyledons. Macmillan, Londres.

[http://www.cactusart.biz/schede/CALIBANUS/Calibanus\\_hookerii/Calibanus\\_hookerii/Calibanus\\_hookerii.htm](http://www.cactusart.biz/schede/CALIBANUS/Calibanus_hookerii/Calibanus_hookerii/Calibanus_hookerii.htm). Consultada el 13 de Agosto 2016.

<https://www.researchgate.net/publication/258627099>. Consultada el 15 de Mayo 2017.

**Hyatt, J. E y Tekrony, D. M.** 2008. Factors influencing the saturated salt accelerated aging test in tomato and onion. Seed Science and Technology. 36(3): 534-545.

- INFOJARDIN.** 2004. Captus y Crasas: Luz y Temperatura. [http://www.infojardin.com/suculentas/luz\\_y\\_temperatura.htm](http://www.infojardin.com/suculentas/luz_y_temperatura.htm). Consultada el 15 de octubre 2016.
- International Seed Testing Association (ISTA).** 2005. Handbook on tetrazolium Testing. Zurich. Switzerland.
- ISTA.** 2012. International Seed Testing Association. 2010. International Rules for Seed Testing. Zürich. Switzerland. 243 p.
- ISTA.** 2010. Internacional Rules for Seed Testing. Basserdorf, CH-Switzerland. Pp 300.
- Judd W.S.,** Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. y Donoghue M.J. 2008. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates, Sunderland, Pp 145-150.
- Jinks R. L y Ciccarese L.** 1997. Effects of soaking, washing, and warm pretreatment on the germination of Russian olive and autumn olive seeds. Tree plant notes. Washington, D.C: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 48 (1/2): 18-23.
- Kavak S., Ilbi H., Eser B.** 2008. Controlled deterioration test determines vigour and predicts field emergence in pepper seed lots. Seed Science and Technology. 36 (2): 456-461.
- Kelly A. F.** 1998. Seed production of agricultural crops. Longman Scientific and Technical John Wiley and Sons. New York, U.S.A. 227 p.
- Khan R. A y H. M. Laude.** 1989. Influence of heat stress during seed maturation on germinability of barley seed harvest. Crop Science. 9: 55-58.
- Krause K.** 1930. *Liliaceae*. In: Engler A. y Prantl K. (Eds). Die Natürlichen Pflanzenfamilien Band 15a, Wilhelm Engelmann, Leipzig, Pp. 227-386.
- López M.L.** 1986. Esfuerzo reproductivo y sobrevivencia de *Nolina parviflora* (*Liliaceae*) en la zona semiárida Poblano-Veracruzana. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx., p. 89.
- López-Castañeda C,** Richards RA, Farquhar GD, Williamson RE. 1996. Seed and seedling characteristics contributing to variation in early vigor among temperate cereals. Crop Sci. 36: 1257-1266.



- Lopez-Granados F y Garcia-Torres L.** 1986. Effects of environmental factors on dormancy and germination of crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed sci.* 44 (2):284-289.
- Lu C. Y.** 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 29: 92-96.
- McDonald Jr. M. B.** 1985. Physical seed quality of soybean. *Seed Science and Technology.* 13: 601-628.
- Mário P.** 2003. *Beaucarnea recurvata.* *In:* rarepalms.com. <http://www.rarepalms.com/pix/BeaRec.shtml>. Consultada el 27 de octubre 2016.
- Matos A;** Molina J y Acosta D. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia* 8(3): 280-284.
- Mathys-Rochon E;** Piola,F; Le-Deunff,E; Mol,R y Dumas,C. 1998. *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. *Jexp bot. Oxford : Oxford University Press.* 49 (322):839-845.
- McVaugh R.** 1989. *Nolina Michaux.* *In:* Anderson W.R. Ed. *Flora Novo-Galiciana: Bromeliaceae to Dioscoreaceae,* The University of Michigan Herbarium, Ann Arbor. 15:240-244.
- Moreno, M. E.** 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., p. 383.
- Murashige y Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum,* 15: 473-479.
- Nakai T.** 1943. Ordines, Familiae, Tribi, Genera, Sectiones. *Novis edit. Appendix. Quaestiones characterium naturalium plantarum.* Chosakuronbun Mokuroku, p. 226.
- National Institutes of Health, Bethesda,** ImageJ, Maryland, USA, [imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), 2012.
- Osorio-Rosales M.L. y Mata-Rosas M.** 2005. Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of *ponytail palms*. *HortScience* 40:1481-1484.

- Pérez, de la C.F.J.**, Córdova T., A. Santacruz, V., F. Castillo G., E. Cárdenas S y A. Delgado A. 2007. Relación entre vigor inicial, rendimiento y sus componentes en poblaciones de maíz chalqueño. *Agricultura Técnica en México* 33:5-16.
- Poinar H. N.**, Kuch M., Sobolik K. D., Barnes I., Stankiewicz A. B., Kuder T., Spaulding W. G., Bryant V. M., Cooper A., Pääbo S. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *PNAS* 98:4317-4322.
- Popinigis F.** 1977. Fisiología de semillas. Ministerio de agricultura. AGIPLAN. Brasilia. Brasil. Pp: 157-233.
- Pence V. C.** 2011. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47: 176-187.
- Poulsen, G., C. y R. Von Bohmer.** 2006. Identification and revival of low viability seed samples. *Genet Resources Crop Evolution* 53, 675-678.
- Ranal, M.A. y Garcia de Santana, D.** 2006. How and why to measure the germination process. *Rev. Brasil. Bot.* 29(1): 1-11.
- Reyes B.Z.** 2002. Ecología de la semilla de *Nolina parviflora* (*Nolinaceae*). Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo de Méx. p 52 .
- Reyes Silva A. I;** Morales Muñoz C. F; Pérez Reyes M. E y Pérez Molphe Balch E. 2013. Propagación *in vitro* de *nolináceas* mexicanas. Número 58. *Investigación y Ciencia*. Mayo-Agosto.
- Rezedowski J.** 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. D.F, p 432.
- Rezedowski J.** 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Bot. Mex*, 14: 3-21.
- Rivera-Lugo M y Solano E.** 2012. Flora del valle de tehuacán-cuicatlán. Instituto de Ecología UNAM. Fascículo 99. *Nolinaceae* Nakai., 99: 1-68.
- Roca C.** 2003. Calidad de semilla en el cultivo de soya. *In: El libro de la soya*. AAPRESIDCREA: Pp. 249-253.

- Rodríguez G. R. E.**, Ponce M. J. F., Rueda P.E.O., Avendaño R.L., Paz H.J.J., Santillano C.J. y Cruz V.M. 2011. Interacción genotipo-ambiente para la estabilidad de rendimiento en trigo de la región de Mexicali B. C. México. *Trop. Subtrop. Agroecosyt.* 14(2): 543-558.
- 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 the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. *Systematics of Beaucarnea and Calibanus* TAXON 63 (6) • December: 1193–1211.
- Samyn G.** 1997. Micropropagation of *Beaucarnea recurvata* Lem. *Syn. Nolina recurvata* (Lem.) Hemmsl. (*ponytail palm*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 40:264-27.
- Sánchez, H.** 2004. Manual tecnológico del maíz amarillo duro y de buenas prácticas agrícolas para el valle de Huaura. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Lima, Perú. p.139.
- SAS Institute.** 2000. *Statistic and Graphics Guide*. Version 9. North Carolina, U.S.A.
- Shah F.S .** C. E. Watson and E. R. Cabrera. 2002. Seed vigor testing of subtropical corn hybrids. *Mississippi Agricultural and Forestry Experiment station.* 23: 1-6.
- SEMARNAT** (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2010. Norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental de 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. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO2454.pdf>
- Sedgley M y Griffin A.** 1989. *Sexual reproduction of tree crops*. London. Academic Press. 378 pp.
- Serrano C. H;** Solano C. E; Ocampo L. A. 2000. Morfología de Semillas, Germinación y Desarrollo Postemergente de Tres Especies del Género *Polianthes L.* (*Agavaceae*). *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 66: 55-65. Distrito Federal, México.
- Shimizu S.S. y Mori H.** 2001. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* Strnad, M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum.* 101: 674-688.

- Solano E.**, García-Mendoza A., Rivera-Lugo. 2012. *Nolina excelsa* (*Nolinaceae*) una especie nueva del estado de Oaxaca, México. *Botanical Sciences* 90 (1): 21-25.
- Standley P.C.** 1920. Trees and shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium 23:94-97.
- Strnad M.** 1997. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 101: 674-688.
- Torres S. 2005.** Contribución al conocimiento de las especies en estatus de conservación legal de Tamaulipas y Nuevo León, México. Maestría en ciencias Forestales. Linares, Nuevo León, México. Pp 100.
- UF (University of Florida).** 2005. *Yucca glauca*. In: *Environmental Horticultura*. Gainesville, FL. <http://hor.ifas.ufl.edu/lppi/htm/sp405.htm>. Consultada el 10 de diciembre de 2016.
- Upadhyaya H.D. y Nigam S.N.** 1999. Inheritance of fresh seed dormancy in peanut. *Madison. Wis. Crop Science Society of America*. 1961. 39 (1): 98-10.
- USDA, ARS,** National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxfam.pl> (17 January 2013).
- USDA FOREST SERVICE** (United States Department of Agriculture). 2004. Botanical and Ecological Characteristics. *Yucca glauca*. Washington, D.C. [http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/yucgla/botanical\\_and\\_ecological\\_characteristics.html](http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/yucgla/botanical_and_ecological_characteristics.html)
- Vadillo P.M del C.** 2012. Organogenesis y regeneración de *Beaucarnea compacta* L. y *Beaucarnea purpusii* Rose, especies endémicas amenazadas. Tesis de Maestría. Universidad autónoma de Querétaro. Octubre. p. 38.
- Vázquez, S. Q.** 2001. Combinación y concentración de reguladores de crecimiento para enraizamiento de sotol (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm ex Trelease) *in vitro*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, UACH. Delicias, Chihuahua, p. 47.

**Walker C.C.** 2001. *Nolina*. In: Egli U. (Ed). Illustrated Handbook of Succulent Plants: Monocotyledons, Springer- Verlag, Berlín, Pp. 291-292.