



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias en Recursos Bióticos



**“Organogénesis y Regeneración de *Beaucarnea compacta* L. Hern. & Zamudio y
Beaucarnea purpusii Rose, especies endémicas amenazadas**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Recursos Bióticos

Presenta:

María del Carmen Vadillo Pro

Querétaro, Qro., octubre de 2012



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias en Recursos Bióticos

“Organogénesis y regeneración de *Beaucarnea compacta* L. Hern & Zamudio y *Beaucarnea purpusii* Rose, especies endémicas amenazadas

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Bióticos

Presenta:

María del Carmen Vadillo Pro

Dirigido por:

Dr. Luis G. Hernández Sandoval

Sinodales

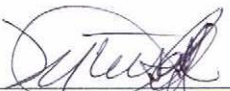
Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Presidente



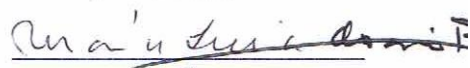
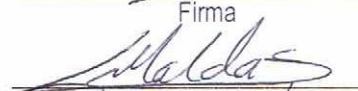
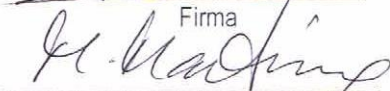

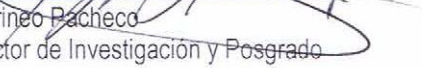
Dr. Martín Mata Rosas
Secretario

Dra. María Luisa Osorio Rosales
Vocal

Dra. Guadalupe Malda Barrera
Suplente

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas
Suplente


Dra. Teresa García Gasca
Director de Facultad


Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2012
México

El presente trabajo de investigación inició en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Autónoma de Querétaro con la asesoría de la Dra. Guadalupe Malda Barrera y se finalizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Red de Manejo Biotecnológico de Recursos del Instituto de Ecología, A. C. bajo la dirección del Dr. Martín Mata Rosas.

Agradecimientos

Primero que nada y muy especialmente, mi agradecimiento más sincero al Dr. Martín Mata Rosas. Gracias por toda la ayuda que me brindaste a lo largo de este año, por todo tu apoyo y amistad y por siempre haber estado dispuesto a ayudarme de la mejor manera, incluso antes de ser mi co-director. Gracias por dirigir mi tesis y por haberme ayudado a sacarla adelante, y sobre todo, gracias porque todos sabemos que esta tesis no hubiera sido lo mismo sin ti.

Gracias al resto de mi comité tutorial, por la ayuda y el apoyo brindado en todo lo que se pudo.

Dra. Mahinda Martínez. Muchas gracias por tu apoyo y por la asesoría en mi proyecto.

Dr. Oscar García Rubio. Gracias por tu asesoría durante la primera parte de la maestría.

Dr. Aurelio Guevara. Gracias por tu asesoría en las pruebas estadísticas.

Dr. Fernando Ortega. Gracias por tu ayuda, paciencia y asesoría en la realización de los cortes histológicos.

Biol. Oliva R. Segura. No tengo tantos renglones para agradecer todo lo que hiciste por mí, de verdad te agradezco de todo corazón porque tu ayuda siempre fue incondicional, sincera y desinteresada. Gracias por haber hecho una pequeña gran diferencia en mi tesis. Pero sobre todo, gracias por ser una gran amiga y una excelente persona en todos los aspectos.

Biol. Oliva R. Segura y Biol. Alejandro Reyes de la Torre. Muchísimas gracias por siempre abrirme las puertas de su casa y por su hospitalidad, por haber sido los mejores amigos de esta maestría y por todo su apoyo en todos los aspectos.

Hugo "Lagarto" Castillo. Muchas gracias por toda tu ayuda en especial en los primeros momentos de la maestría, gracias por tu amistad y por ser una gran persona.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Ecología, A.C. por su compañía, alegría, apoyo y amistad.

Muchas gracias a mis padres y a mis hermanos por su ayuda incondicional, por darme ánimos, por siempre estar para mí y porque esto no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Y gracias a mí, porque estuve a punto de fallar, pero no lo hice.

"Agradezco a todos los que me dijeron que no, porque gracias a ellos lo hice yo mismo." Albert Einstein.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Conservación de especies	5
Conservación de especies en México: situación actual.....	7
Familia Asparagaceae.....	8
Clasificación taxonómica	8
Situación actual de la subfamilia Nolinoidea	8
El género <i>Beaucarnea</i> Lem.....	9
<i>Beaucarnea purpusii</i> Rose	10
<i>Beaucarnea compacta</i> L. Hern. & Zamudio.....	10
Conservación de especies de <i>Beaucarnea</i>	11
Cultivo de tejidos vegetales.....	12
Medio de cultivo.....	13
Propagación <i>in vitro</i>	16
Organogénesis directa.....	17
Micropropagación	18
Problemas en el CTV.....	20
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Beaucarnea</i>	23
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
METODOLOGÍA	27
Recolecta de material biológico	27
Germinación	27
Siembra de semillas	28
Fase de inducción	28
Medio de cultivo MS semi sólido.....	28
Crecimiento de brotes adventicios en medio de cultivo semi-sólido.....	29
Tratamientos por pulsos en medio de cultivo MS líquido.....	29
Fase de elongación	30
Fase de enraizamiento	30
Fase de aclimatación	31
Pruebas estadísticas	31
RESULTADOS	32
Germinación	32
Fase de inducción de <i>Beaucarnea purpusii</i> en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar	32
Supervivencia de los explantes	32

Respuestas morfogénicas	34
Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes.....	38
Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento.....	40
Análisis de formación de brotes por explante con respuesta por tratamiento	42
Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de <i>Beaucarnea purpusii</i>	44
Supervivencia de los brotes adventicios	45
Análisis del efecto de los tratamientos en el crecimiento de los brotes adventicios formados a partir de hojas de <i>Beaucarnea purpusii</i>	46
Cortes histológicos para la determinación del origen de los brotes adventicios formados a partir de hojas de brotes de <i>Beaucarnea purpusii</i>	48
Fase de inducción de <i>Beaucarnea purpusii</i> en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar	49
Supervivencia de los explantes	49
Respuestas morfogénicas	50
Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes.....	51
Análisis de formación de brotes por explantes totales.....	52
Análisis de formación de brotes por explante con respuesta	55
Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de <i>Beaucarnea purpusii</i>	57
Fase de inducción de <i>Beaucarnea purpusii</i> en medio de cultivo líquido por tratamiento por pulsos	58
Supervivencia de los explantes	58
Respuestas morfogénicas	61
Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes.....	61
Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento.....	64
Análisis de formación de brotes por explante con respuesta por tratamiento	69
Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de <i>Beaucarnea purpusii</i>	73
Fase de inducción de <i>Beaucarnea compacta</i> en medio de cultivo semi-sólido	74
Supervivencia de los explantes	74
Respuestas morfogénicas	74
Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes	75
Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento.....	76
Análisis de formación de brotes por explantes con respuesta por tratamiento.....	77
Fase de enraizamiento	80
Fase de enraizamiento de <i>Beaucarnea purpusii</i>	80
Fase de enraizamiento <i>Beaucarnea compacta</i>	81
Fase de aclimatación	84
Fase de aclimatación de <i>Beaucarnea purpusii</i>	84
Fase de enraizamiento de <i>Beaucarnea compacta</i>	84
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS	97

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tratamientos con pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempos de exposición en medio de cultivo MS líquido sobre secciones longitudinales de plántulas <i>Beaucarnea purpusii</i>	30
2. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y 0.6% de agar	34
3. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i>	41
4. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta	43
5. Incremento de altura de brotes adventicios de <i>Beaucarnea purpusii</i> formados a partir de hojas de brotes previamente formados en tratamientos adicionados con TDZ, sembrados en diferentes tratamientos	47
6. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y 0.8% de agar	50
7. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i>	54
8. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta	56
9. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempos de exposición.....	60
10. Efecto de pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempo de exposición sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i>	67
11. Efecto de pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempo de exposición sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta.....	70
12. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y una concentración de agar del 0.8%.....	74
13. Efecto de diferentes concentraciones de BA y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea compacta</i>	77
14. Efecto de diferentes concentraciones de BA y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de <i>Beaucarnea compacta</i> con respuesta.....	78
15. Porcentaje de enraizamiento de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> a los 45 días provenientes de diferentes tratamientos	82

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Ejemplares de <i>Beaucarnea</i>	10
2. Ejemplares adultos en su hábitat natural.....	27
3. Pérdida de explantes	34

4. Respuestas de los explantes de <i>Beaucarnea purpusii</i> a los 30 días de la siembra sembrados en diferentes tratamientos	36
5. Origen de los brotes.....	36
6. Respuestas morfológicas de explantes de <i>Beaucarnea purpusii</i>	37
7. Formación de brotes múltiples de <i>Beaucarnea purpusii</i> al tercer mes de su siembra en medio MS adicionado con diferentes tratamientos	37
8. Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de <i>Beaucarnea purpusii</i> previamente formados en tratamientos adicionados con TDZ	46
9. Corte histológico de un brote adventicio formado a partir de la hoja de un brote formado previamente en un tratamiento adicionado con TDZ, se muestra la zona de unión de los haces vasculares.....	48
10. Formación de brotes a partir de explantes de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembrados en tratamientos expuestos a pulsos	59
11. Formación de brotes múltiples de <i>Beaucarnea compacta</i> a partir de explantes sembrados en medio MS adicionado con BA.....	76
12. Brotes con raíz.....	82
13. Plántulas aclimatadas.....	85

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Porcentaje de germinación de semillas de <i>Beaucarnea purpusii</i> y de <i>B. compacta</i> durante 45 días.....	32
2. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y diferentes concentraciones de citocininas	39
3. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionados con citocininas y 0.6% de agar.....	41
4. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y una concentración de agar del 0.6%.	43
5. Promedio de brotes normales y adventicios desarrollados a partir de hojas de brotes formados a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de TDZ y de agar al 0.6%.	44
6. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con una concentración de agar del 0.8% y con diferentes concentraciones de citocininas	52
7. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y agar al 0.8% ...	54
8. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y 0.8% de agar	56
9. Promedio de brotes normales y adventicios desarrollados a partir de hojas de brotes formados a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> en medio de cultivo MS adicionado con diferentes concentraciones de TDZ y una concentración de agar del 0.8%	57
10. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembradas en medio de cultivo MS líquido expuestos a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición.....	63

11. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de <i>Beaucarnea purpusii</i> sembradas en medio de cultivo MS líquido expuestos a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición.....	63
12. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición.....	68
13. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> sometidos a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición.....	68
14. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición	72
15. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea purpusii</i> con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición	72
16. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de <i>Beaucarnea compacta</i> sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de BA y 0.6% de agar.....	75
17. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea compacta</i> sometidos a diferentes concentraciones de BA.....	77
18. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>Beaucarnea compacta</i> con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de BA.....	78
19. Porcentaje de brotes con formación de raíces a los 15, 30 y 45 días, sembrados en diferentes tratamientos	83

RESUMEN

Las especies *Beaucarnea purpusii* Rose y *B. compacta* L. Hern. & Zamudio son dos especies endémicas de México y se encuentran amenazadas por su restringido endemismo y porque son altamente saqueadas. El presente trabajo propone un método para la micropropagación de ambas especies, con el fin de fomentar su conservación. Se sembraron semillas de las dos especies en medio de cultivo semi-sólido MS y se evaluó la germinación *in vitro*. Cuando las plántulas tenían entre tres y cuatro meses, se extrajeron del medio de cultivo, se cortaron las hojas y las raíces y se dividieron los tallos en dos secciones longitudinales, para eliminar la dominancia apical, éstos se consideraron como explantes. Para la fase de inducción de *B. purpusii*, los explantes se sembraron en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de BA, KIN y TDZ y gelificado con 0.6% de agar, se repitió el experimento con las mismas citocininas y gelificado con 0.8% de agar, además se realizó un tercer experimento utilizando medio de cultivo MS líquido adicionado con diferentes concentraciones de BA y TDZ durante diferentes tiempos de exposición. Para la fase de inducción de *B. compacta*, los explantes se sembraron en medio de cultivo semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de BA. Una vez terminada la fase de inducción de todos los explantes, se subcultivaron a medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 1 g/L de carbón activado para permitir el desarrollo de los brotes formados en la fase de inducción. La respuesta morfogénica obtenida a partir de explantes de las especies fue la formación de brotes múltiples por medio de organogénesis directa. Se formaron tres tipos de brotes: hiperhidratados, normales y brotes adventicios a partir de hojas de otros brotes. El tratamiento más efectivo para la propagación de *B. purpusii* fue el medio semi-sólido adicionado con una concentración de agar del 0.6% y 0.1 mg/L de TDZ, en el cual se registró un promedio de 40.21 brotes normales por explante con respuesta. El tratamiento más efectivo para la propagación de *B. compacta* fue medio de cultivo semi-sólido adicionado con una concentración de 5 mg/L de BA, el cual indujo un promedio de 23.6 brotes normales por explante con respuesta. Una vez obtenidos los brotes de ambas especies, éstos se individualizaron y se sembraron en seis tratamientos que incluyeron medio MS y medio MS al a mitad de su concentración (MS50) adicionados con diferentes concentraciones de carbón activado, con el fin de inducir su enraizamiento. En todos los tratamientos se registró enraizamiento, pero el mejor tratamiento para el enraizamiento de los brotes de *B. purpusii* fue el medio de cultivo MS adicionado con 0.5 g/L de carbón activado; y para *B. compacta* fue el medio MS50 sin carbón activado. Ambas especies se lograron aclimatar con éxito, cuando las plántulas estaban en buen estado la supervivencia de las plántulas *ex vitro* fue del 100% para ambas especies.

ABSTRACT

Species *Beaucarnea purpusii* Rose and *B. compacta* L. Hern. & Zamudio are two endemic Mexican species and they are endangered because their restricted endemism and because they are highly looted. This work proposes a micropropagation method for both species with the purpose to increase their conservation. Both species seeds were sown in jars containing MS culture medium and *in vitro* germination was evaluated. When plantlets were around three to four months they were taken out the culture medium, the leaves and roots were cut and the stem was cut in two longitudinal sections with the purpose to eliminate apical dominance, this tissue was considered as explants. For *B. purpusii* induction phase it was used MS culture medium supplemented with different concentrations of BA, KIN and TDZ and it was solidified with 0.6% agar, the experiment was repeated with same cytokinins but solidified with 0.8% agar, also a third experiment was carried out using liquid MS medium culture supplemented with different concentrations of BA and TDZ during different exposure times (pulse). For *B. compacta* induction phase, explants were swon in MS culture medium supplemented with different concentrations of BA. Once the induction phase for all explants was over, the explantes were subcultured to MS semi-solid medium supplemented with 1 g/L of activated charcoal to permit the development of the formed shoots. The morphogenetic response obtained from the explants of both species was the multiple shoot formation through direct organogenesis. Three types of shoots were formed: hyperhidric, normal and adventitious shoots formed from leaves. The most effective treatment for *B. purpusii* was MS semi-solid culture medium supplemented with 0.6% agar and 0.1 mg/L TDZ, in this treatment an average of 40.21 normal shoots per responding explant was recorded. The most effective treatment for *B. compacta* was MS semi-solid culture medium supplemented with 5 mg/L BA, this treatment induced an average of 23.6 normal shoots per responding explant. Both species shoots were individualized and subcultured in six different treatments to induce rooting, which include MS medium, half concentrated MS medium (MS50) added with different concentrations of activated charcoal. All treatments induced rooting, but the best treatment for *B. purpusii* rooting was MS medium cultured supplemented with 0.5 g/L of activated charcoal and the best treatment for *B. compacta* rooting was MS50 medium culture without activated charcoal. Acclimatization was successful for both species, when plantlets were in good conditions *ex vitro* survival was 100% for both species.

INTRODUCCIÓN

El género *Beaucarnea* pertenece a la familia Asparagaceae (subfamilia Nolinoideae) y es endémico de Centro América. Actualmente se conocen once especies, diez de las cuales son se encuentran en México y ocho son endémicas. Nueve de las especies se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2011), ocho están en la categoría de amenazadas y una en peligro de extinción. Entre los factores que ponen en riesgo al género destacan la sobreexplotación de semillas, plántulas e individuos adultos, su lento crecimiento, pero principalmente por la pérdida de su hábitat (Hernández, 2001; Goluba *et al.*, 2007; Contreras *et al.*, 2008).

Dos especies requieren atención especial. *B. purpusii*, por ser la única especie del género que se encuentra en la categoría de peligro de extinción de la NOM-059-SEMARNAT-2010 y tiene altos niveles de saqueo (Hernández *et al.*, 2009) y *B. compacta* que ha sido descrita recientemente (Hernández y Zamudio, 2003), y ha sido registrada en muy pocos sitios y es saqueada como planta ornamental (Hernández *et al.*, 2009). A pesar que no se encuentra listada en la NOM se considera en peligro y actualmente se están llevando a cabo los estudios para determinar su estatus (Hernández, Com. Pers.).

Es fundamental incrementar el conocimiento de estas especies para poder generar estrategias para su conservación. Los programas de conservación de plantas incluyen estudios ecológicos *in situ*, por ejemplo, el manejo de hábitat y poblaciones, la creación de áreas naturales protegidas, entre otras; otra alternativa es la conservación *ex situ* que incluye a los bancos de genes y semillas, conservación de germoplasma y la propagación vegetal en invernaderos o por cultivo de tejidos vegetales (Fay, 1992; Possiel *et al.*, 1995; Pence, 2010).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta muy útil en los planes de conservación de especies (Paunescu, 2009; Pence, 2010), ya que asegura la producción y rápida multiplicación de material libre de enfermedades (Engelmann, 2011) y se utiliza cuando las semillas de las especies no son viables, no se encuentran con facilidad o cuando no es posible propagar las plantas vegetativamente (Pence, 2010). El establecimiento del cultivo *in vitro* tiene un beneficio inmediato en la conservación de especies porque se reduce la presión en la colecta de poblaciones silvestres, ya que se tiene un constante suministro del material para realizar estudios y para satisfacer parte de la demanda comercial (Paunescu, 2009).

Se ha logrado la propagación *in vitro* de algunas especies suculentas que se encuentran amenazadas (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); entre ellas están especies de *Beaucarnea* (Samyn, 1993; Osorio y Mata, 2005; Bettaieb *et al.*, 2008), pero es necesario continuar con su estudio, ya que los protocolos de propagación deben de definirse para cada especie o variedad vegetal, motivo por el cual el presente trabajo establece las bases para la propagación *in vitro* de *B. purpusii* y *B. compacta* a partir de secciones longitudinales de tallos con el fin de incrementar y preservar el material vegetal.

ANTECEDENTES

Conservación de especies

La conservación se define como el mantenimiento de la biodiversidad a nivel de genes, especies y ecosistemas (Hunter y Gibbs, 2007). La conservación es un tema muy importante de las últimas décadas, ya que la biodiversidad mundial ha decrecido en una tasa muy alta (Engelmann, 2011).

La alteración del hábitat, la explotación legal e ilegal de los recursos, la presión antropogénica, el cambio de especies nativas por agricultura, la invasión de especies exóticas, la falta de conocimiento para el aprovechamiento sustentable de las especies y el cambio climático son algunos factores que hacen que muchas de las especies sean catalogadas como raras, amenazadas o en peligro de extinción (Kant *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2011). A pesar que la extinción de especies es un proceso natural, la velocidad a la que se extinguen las especies actualmente, ocasionada por la intervención humana, es aproximadamente entre 100 y 1000 veces más rápida que la velocidad natural de extinción (Kant *et al.*, 2009).

Debido a esta problemática se ha tenido que buscar métodos para evitar la extinción. La biología de la conservación es una ciencia multidisciplinaria que surgió como respuesta a la pérdida generalizada de la biodiversidad. En esta ciencia se considera a la biodiversidad en varios niveles (genes, especies y ecosistemas) y su objetivo es el diagnóstico y prevención de las causas de su deterioro (Tellería, 1999; Hunter y Gibbs, 2007).

Desde mediados del siglo XIX ya existía una preocupación por la pérdida de especies (Tellería, 1999). Sin embargo, los esfuerzos de conservación de la naturaleza iniciaron hasta 1930, pero fueron opacados por el crecimiento acelerado de las actividades productivas en las décadas de 1940 y 1950. En estas décadas el interés por la conservación de los recursos era poco y se basaba principalmente en grupos académicos y en asociaciones no gubernamentales (CONABIO, 2009). Fue hasta 1992 que se empezó a tener una mayor conciencia y se empezaron a llevar a cabo acciones por la conservación cuando en una conferencia de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) sobre ambiente y desarrollo en Río de Janeiro se discutió por primera vez la conservación de la biodiversidad y tomó mayor interés este problema para los líderes mundiales (Possiel *et al.*, 1995). En México fue hasta 1994 que se adecuaron políticas públicas al sector ambiental y comenzó a haber una mayor preocupación por parte del gobierno (CONABIO, 2009). A pesar de los esfuerzos que se han hecho por la conservación

todavía no son suficientes pues existen muchas especies que no tienen prioridad debido a la falta de conocimiento sobre su uso y potencial económico (Kant *et al.*, 2009).

La conservación de especies vegetales es un tema importante dentro de la biología de la conservación debido a la situación en que se encuentran muchas de especies a nivel mundial. Tal como menciona Sarasan *et al.*, (2006), de 1996 a 2004 un total de 8,321 especies de plantas se nombraron en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN). Además se ha incrementado en un 60% las especies de plantas consideradas en peligro crítico (Engelmann, 2011).

Es necesario planear actividades de conservación y aplicarlas rápido, en especial a especies que están en la categoría de extinción (Sarasan, 2010). Existen dos formas de conservar los recursos: *in situ* o *ex situ*. Los esfuerzos combinados de la conservación *in situ* y *ex situ* pueden ser muy importantes para la preservación de la biodiversidad de muchos hábitats amenazados (Reed *et al.*, 2011).

La conservación *in situ* es primaria y comprende la protección de áreas naturales donde se encuentra el recurso. Se recomienda usar métodos de conservación *in situ* porque son más seguros y económicos. Además la conservación *in situ* puede comprender una cobertura amplia de los recursos, permite que continúe la selección natural, evolución en la comunidad y se produce nuevo material genético. Finalmente puede traer beneficios económicos a la comunidad si es que la especie tiene potencial como ornamental, valor genético o bioquímico. El reto de estos métodos es que es necesario expandir las áreas naturales protegidas (ANPs) y desarrollar nuevos modelos de conservación (Possiel *et al.*, 1995).

La conservación *in situ* no siempre es suficiente para salvar a las especies en peligro (Reed *et al.*, 2011). La proporción de las ANPs decretadas para la conservación es insuficiente, tanto a escala nacional como internacional (Golubov *et al.*, 2007). En muchas ocasiones se requiere de técnicas de conservación *ex situ* como complemento y en el peor de los casos es la única opción (Paunescu, 2009; Pence, 2010; Engelmann, 2011).

La conservación *ex situ* tiene como objetivos preservar muestras representativas vivas de organismos fuera de su hábitat natural, propagar plantas y en algunos casos se busca restablecer poblaciones nuevas en el hábitat natural (Possiel *et al.*, 1995; CONABIO, 2009). Las formas más comunes de esta conservación son los jardines botánicos, bancos de semillas y polen y la propagación en viveros o por medio de cultivo de tejidos vegetales (CTV) que incluye

germinación *in vitro*, producción de propágulos y criopreservación (Engelmann, 2011; Pence, 2011; Reed *et al.*, 2011). Las técnicas de CTV sumadas a técnicas *ex vitro* podrían ser parte de una solución para el rescate de especies en peligro de extinción (Sarasan, 2010).

Conservación de especies en México: situación actual

México es un país megadiverso debido a su elevado número de especies, endemismos, ecosistemas y por la gran variabilidad genética de muchos grupos taxonómicos. Cerca de dos terceras partes de la biodiversidad mundial se localiza en los países megadiversos y a nuestro país se le considera el cuarto en riqueza de especies (CONABIO, 2009).

La gran diversidad se debe principalmente a que en el país concurren dos zonas biogeográficas la Neártica y la Neotropical, posee casi todos los climas que existen y tiene una topografía muy accidentada y una compleja geología. Todos estos factores hacen que el país cuente con la gran mayoría de ecosistemas del mundo y que tenga un gran número de endemismos (Rzedowski, 2006).

En el México se han descrito más de 25,000 especies de plantas vasculares, siendo uno de los cinco países con mayor número de especies de plantas vasculares del mundo. Se estima un total de plantas entre 27,000 y 30,000 y se cree que entre el 50 y 60% de las especies distribuidas en México son endémicas (Rzedowski, 2006; CONABIO, 2009; PROFEPA, 2010).

A pesar de la importancia biológica del país, no existe un uso sustentable ni racional de los recursos. Los principales factores de extinción de especies vegetales son el cambio de uso de suelo, la fragmentación de ecosistemas por actividades humanas, la extracción ilegal e irracional de especies y el cambio climático (CONABIO, 2009; PROFEPA 2010). Estas razones hacen que muchas especies estén amenazadas o en peligro, un total de 987 de especies vegetales se encuentran en alguna categoría dentro de la NOM-59-SEMARNAT-2010.

Muchas familias vegetales de México se encuentran en riesgo, debido a que muchas o la mayoría de sus especies se encuentran amenazadas. Tal es el caso de la familia Asparagaceae, subfamilia Nolinoidea, que se encuentra amenazada varias de sus especies se encuentran en alguna categoría de la Norma Oficial Mexicana 059.

Familia Asparagacea

Clasificación taxonómica

Renio: Vegetal

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidadae

Superorden: Liliales

Orden: Asparagales

Familia: Asparagaceae

Subfamilia: Nolinoidea

Género: *Beaucarnea*

La familia Asparagaceae está dividida en siete subfamilias y tienen distribución mundial (Stevens, 2010). La clasificación taxonómica de la familia Asparagaceae ha sido compleja, los géneros de la familia no poseen ninguna característica que las unifique y algunas de las subfamilias son difíciles de reconocer (Stevens, 2010). Anteriormente se consideraba parte de la familia Agavaceae, posteriormente algunos de los géneros eran considerados dentro de la familia Liliaceae y actualmente se conoce como Asparagaceae (Stevens, 2010). Existen trabajos moleculares que han comprobado la clasificación del grupo (Eguiarte, 1995).

La subfamilia Nolinoidea, anteriormente considerada como familia Ruscaceae, se distribuye mundialmente en regiones templadas y tropicales. Algunos de los géneros que se distribuyen en México son *Beaucarnea* (patas de elefante, despeinada) *Dasyllirion* (sotól), *Nolina* (soyate) y *Calibanus* (CONAFOR-SEMARNAT, 2009).

Situación actual de la subfamilia Nolinoidea

A nivel internacional, la subfamilia Nolinoidea no cuenta con protección legal. Ninguna de las especies se encuentra representada en la lista roja de la UICN (Golubov *et al.*, 2007). En México, varias especies de la subfamilia se encuentran en alguna categoría de la NOM-059-ECOL-2010. A pesar de esto, el área decretada de ANPs es insignificante y la familia se encuentra poco representada. Además, el factor humano pone en riesgo a las especies,

especialmente por la destrucción, modificación de hábitats, el uso no sustentable de las especies con valor económico como la pata de elefante (*Beaucarnea* spp.), los sotoles (*Dasyllirion* spp.) y sacamecate (*Calibanus* spp.), y por la colecta excesiva e ilegal (Golubov *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2012).

Es necesario ampliar la conservación *in situ* de la subfamilia Nolinoidea para su protección legal y para poder incrementar los estudios biológicos sobre ella. La conservación *ex situ* también es fundamental, pues existen pocos trabajos al respecto (Hernández *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008; Golubov *et al.*, 2007; Osorio y Mata, 2005).

Beaucarnea es el género dentro de la subfamilia que cuenta con más especies en alguna categoría de la NOM-059-ECOL-2010. En los últimos años se han decomisado miles de ejemplares de este género, principalmente en los estados de Veracruz, Puebla, Campeche, Tabasco y Guerrero (Hernández *et al.*, 2012; CONAFOR-SEMARNAT, 2009).

El género *Beaucarnea* Lem.

El género *Beaucarnea* se conoce comúnmente como pata de elefante. Se conocen once especies, diez de las cuales se distribuyen en México y ocho son endémicas (Irish e Irish, 2000; CONAFOR-SEMARNAT, 2009). Las especies se distribuyen en selva baja y en matorral xerófito y habitan en asociaciones con *Yucca* sp., *Agave* sp., y *Hechita* sp. (Hernández *et al.*, 2012; Irish e Irish 2000; Hernández *et al.*, 2009).

Las mayoría de las especies son arborescentes, excepto *Beaucarnea compacta* que es arbustiva, son monocotiledóneas, dioicas, con base globosa (CONAFOR-SEMARNAT, 2009). Tienen hojas lineales con pequeños dientes en los bordes y emergen de un punto de crecimiento con forma simétrica radial formando una roseta. Algunas especies del género tienen varias ramas recurvadas, mientras otras tienen pocas y rectas. Las flores son color amarillo pálido y se agrupan en una inflorescencia alargada que nace arriba de la roseta y son polinizadas por insectos. El fruto es indehisciente, de forma elipsoide, con alas, contiene una semilla por cada fruto y es característico en cada especie. El tamaño y forma del tronco y las placas de la corteza son característicos de cada especie (Irish e Irish, 2000; Hernández y Zamudio, 2003; Hernández *et al.*, 2009).

***Beaucarnea purpusii* Rose**

La especie *B. purpusii* se distingue de las demás porque posee placas irregulares en su corteza, sus hojas son erectas y se quedan adheridas al tallo al secarse (Figura 1). Su distribución está restringida a las zonas áridas de Puebla y Oaxaca en la región de Tehuacán-Cuicatlán (Hernández *et al.*, 2009). Se encuentra en la categoría de peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010, es la única de las especies del género que se encuentra en esta categoría.

***Beaucarnea compacta* L. Hern. & Zamudio**

La especie *B. compacta* (Figura1) se distingue de las demás porque es la única dentro del género que no posee un tallo alargado, presenta una base globosa de la cual salen las hojas (Hernández y Zamudio, 2003). Está restringida a la parte semiseca de la Sierra Madre Oriental de Guanajuato. Habita en laderas de entre 70 y 90% de pendiente, sobre rocas ígneas en comunidades de matorral rosetófilo (Hernández *et al.*, 2009) entre 1300 y 1400 msnm (Hernández y Zamudio, 2003; Hernández *et al.*, 2009). Esta especie no se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010 pero se considera en peligro de extinción debido a que está registrada a pocas localidades y las poblaciones son pequeñas (Hernández, L. Comn, Pers.).



Figura 1. Ejemplares de *Beaucarnea*. A) *B. purpusii* en su hábitat natural. B) *B. compacta* en invernadero de la U.A.Q.

Conservación de especies de *Beaucarnea*

Ocho de las especies del género *Beaucarnea* están representadas en ANPs, pero la conservación es insuficiente. La mayoría de las poblaciones se encuentran en estado crítico por la continua fragmentación y destrucción de su hábitat, ocasionada por la expansión de la frontera agrícola y ganadera, extracción de leña, madera y crecimiento urbano. Además, el saqueo de semillas e individuos afecta el tamaño de la población y la proporción de los sexos, reduciendo las posibilidades de fertilización y la producción de semillas (Contreras *et al.*, 2008). Por lo anterior, es importante recurrir a estrategias de conservación *ex situ*.

Las especies de el género *Beaucarnea* se propagan principalmente por su valor ornamental (Contreras *et al.*, 2008). Algunas de ellas se propagan en viveros para su comercialización y la que se encuentra más comúnmente es *B. recurvata*. La propagación en vivero generalmente es por semillas y en ocasiones por hijuelos pero estos no nacen con frecuencia ni se han observado en todas las especies (Osorio *et al.*, 2011; Irish e Irish, 2000).

La germinación de las semillas del género *Beaucarnea* es exitosa ocurriendo entre la primera y tercera semana de la siembra (Osorio *et al.*, 2011; Irish e Irish, 2000). Se ha registrado que especies del género *Beaucarnea* germinan rápido y en alto porcentaje. *B. recurvata* alcanzó una germinación del 95.3% y *B. gracilis* del 89.8% en medio de cultivo MS después de 30 días después de la siembra y su germinación comenzó al quinto día (Osorio y Mata, 2005). Se han registrado tasas de germinación *in situ* para *B. inermis* por encima del 80% en su localidad (Castillo-Gómez y Hernández, 2011). En un informe de *B. purpusii* (Hernández *et al.*, 2009) se registró un bajo porcentaje de germinación *in vitro* (38%), se menciona que las semillas pudieron haber necesitado de un método de escarificación previa. Para *B. plibilis* se registró casi un 90% de semillas germinadas y comenzó a los 29 días de la siembra, estas pruebas se realizaron en vivero (Hernández *et al.*, 2009).

Anteriormente, sólo se sabía de dos Unidades de Manejo y Aprovechamiento (UMA) registradas ante la SEMARNAT donde propagan *B. recurvata*, ubicadas en Veracruz, y son la UMA "3 de Mayo" y el Vivero "Mundo Verde". Actualmente se ha incrementado el número de UMAs en el estado a 25 (Osorio, M. Com. Pers). *B. recurvata* tiene mucho potencial ornamental y es muy común encontrarla en viveros y en otros sitios de comercialización, pero no se tiene conocimiento si esta práctica es legal.

Las limitaciones de la propagación en vivero de especies del género *Beaucarnea* son que el crecimiento de la mayoría de las especies es lento, no crecen casi individuos juveniles y en algunas especies no se encuentran con facilidad las semillas (Hernández Comn. Pers.; Irish e Irish 2000). Por lo tanto, se requiere buscar otras alternativas para su propagación, una alternativa que destaca es el cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro*.

Cultivos de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una herramienta de conservación *ex situ*. Se utiliza con fines de preservación y multiplicación vegetal y comprende a la germinación *in vitro* de las semillas, la multiplicación de propágulos y la aclimatación de las plántulas ya sea con fines de crioconservación (almacenamiento a largo plazo a una temperatura de -196° C), proyectos de reintroducción o para su comercialización legal (Sarasan, 2010; Reed *et al.*, 2011).

El CTV se define como un conjunto de técnicas para el crecimiento de células, tejidos y órganos vegetales donde un explante (sección de una planta) se cultiva asépticamente en un medio artificial con condiciones físicas y químicas definidas y en condiciones ambientales controladas (Goldstein, 2000; Mroginski *et al.*, 2010). Entre las ventajas del CTV destacan: ayuda a controlar variables ambientales como luz, temperatura, gases y nutrimentos, evita la competencia con otros organismos y es posible tener plantas libres de microorganismos dañinos como las bacterias, hongos, virus, algas y otros parásitos (Roca y Mroginski, 1991; Goldstein, 2000). Los principales propósitos del CTV son la preservación del material vegetal, para la rápida propagación de plantas, el estudio de metabolitos secundarios, investigación de rutas metabólicas, mejoramiento genético, entre otras (Mederos-Molina, 2001).

Las técnicas de CTV son efectivas en diversas fases del desarrollo de las plantas, que van desde la germinación hasta la multiplicación de propágulos. Se recomienda utilizar CTV cuando las semillas son recalcitrantes, es decir, pierden su viabilidad cuando están en situaciones de deshidratación, esto puede ocurrir en bancos de semillas (George *et al.*, 2008; Sarasan, 2010). También se recomienda establecer *in vitro* a las semillas que tengan un bajo porcentaje de germinación, ya que algunas especies germinan más rápido *in vitro* que con métodos convencionales (Fay, 1994). El crecimiento y supervivencia de algunas especies también es mayor en CTV porque se les provee con todos los nutrimentos necesarios para su desarrollo (Mroginskiet *al.*, 2010). Por último, se recomienda utilizar CTV para la preservación y

multiplicación de las plantas cuando las semillas no se encuentran con facilidad o no son viables, cuando los explantes no son muy abundantes, no responden como propágulos o cuando el material vegetal es difícil de coleccionar por estar en peligro de extinción o en zonas remotas (Sarasan *et al.*, 2006; Pence, 2010).

El cultivo de tejidos vegetales puede llevarse a cabo por medio de diferentes técnicas. Puede ser en medio de cultivo semi-sólido, el cual es muy utilizado para el establecimiento de explantes. En éste el tejido sólo está en contacto con el medio por una parte, lo que hace que haya un gradiente de nutrientes y que la difusión de gases pueda estar restringida por el medio alrededor (George *et al.*, 2008). El medio de cultivo líquido es utilizado para suspensiones celulares, para experimentos de nutrición, crecimiento y diferenciación en callos. Dentro del medio de cultivo líquido existen varias técnicas como son los sistemas de inmersión temporal, los biorreactores y el tratamiento por pulsos (George *et al.*, 2008). El tratamiento por pulsos es cuando un tejido es expuesto a altas concentraciones de sustancias, especialmente de reguladores del crecimiento, durante un período corto de tiempo. En ocasiones dar un pulso de un regulador del crecimiento a concentraciones relativamente altas puede ser igual o más efectivo que una baja concentración que se presenta de manera continua (Thomas y Tranvan, 1982). Para tener éxito en los tratamientos por pulsos hay que tomar en cuenta que el tiempo de exposición a los reguladores es clave para inducir las respuestas morfogénicas (Moncaleán *et al.*, 2001).

Medio de cultivo

Para poder llevar a cabo el cultivo *in vitro* se necesita establecer al tejido u órgano vegetal en un medio artificial especializado para su crecimiento (George *et al.*, 2008). A este se le conoce como medio de cultivo y se define como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la manipulación de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

El medio de cultivo debe constar de los siguientes elementos básicos (Smith, 2000; George *et al.*, 2008; Mroginski *et al.*, 2010):

Agente solidificante. Se añade al medio de cultivo para que adquiera la consistencia semisólida. Este puede ser: agar, gellan-gum, agargel, transfergel, phytigel, agarosa o gelrite. El más utilizado es el agar en concentraciones entre el 0.6 y el 1 % (Radice, 2010). Existen muchas marcas de agar, las cuales tienen diferente composición de elementos y diferente calidad, esto

podiera afectar la respuesta morfogénica del explante debido a que pueden contener sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento (George *et al.*, 2008; Radice, 2010).

Fuente de carbono. Los carbohidratos son clave para el éxito en el cultivo *in vitro*, sirven como fuente de energía y de carbono, así como de agente osmótico. La sacarosa es casi universal en el CTV para propósitos de propagación y se utiliza en concentraciones entre 2 y 4%. La presencia de la sacarosa en el medio de cultivo inhibe la formación de clorofila y parte de la fotosíntesis.

Nutrientes minerales. Son esenciales para el desarrollo de las plantas y se dividen en macro y micro nutrientes. La concentración varía dependiendo del medio de cultivo, pero en general tienen los mismos nutrientes esenciales. Los macronutrientes son los elementos que necesita en grandes cantidades y son: Nitrógeno (N), Potasio (K), Calcio (Ca), Fósforo (P), Magnesio (Mg) y Azufre (S). Los micronutrientes los requiere en pequeñas cantidades y son: Hierro (Fe), Níquel (Ni), Cloro (Cl), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Estos elementos en conjunto con Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O) forman los 17 elementos esenciales para el desarrollo de las células vegetales.

Compuestos orgánicos. El crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales pueden ser mejorados por pequeñas cantidades de nutrientes orgánicos. Estos son principalmente aminoácidos, vitaminas y suplementos. La cantidad de estas sustancias puede variar dependiendo la especie y el genotipo. Las cantidades se encuentran estandarizadas en la formulación del medio de cultivo que se vaya a utilizar.

Aminoácidos. Son utilizados como fuente de nitrógeno reducido. En ocasiones es innecesario añadir aminoácidos al medio de cultivo, pero esto varía con la especie y se debe comprobar experimentalmente. Tanto el crecimiento como morfogénesis son muy influenciados por la disponibilidad del nitrógeno y por la forma en que está presente. La glicina es un aminoácido que se utiliza comúnmente y está en la formulación del medio de cultivo MS.

Vitaminas. Son necesarias para el metabolismo de las plantas porque tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas. Se producen en las células vegetales pero las plantas cultivadas *in vitro* pueden ser deficientes, por lo que es necesario añadirlas al medio de cultivo para mejorar el crecimiento y supervivencia. Las más utilizadas son tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico (niacina), y piridoxina (vitamina B6). El requerimiento de las vitaminas varía con cada especie y el explante; a menos de que se haga una investigación particular del tejido u órgano utilizado, no es posible determinar si la vitamina fue esencial en el experimento.

Myo-inositol. Algunas veces se considera como vitamina y otras veces la clasifican como un carbohidrato suplementario aunque no contribuye al uso como fuente de energía. En el medio de cultivo puede promover el crecimiento del tejido porque estimula la división celular, además se ha encontrado que ayuda en el proceso de germinación, el transporte del azúcar, la nutrición mineral, homeostasis hormonal, entre otras funciones. Es un compuesto esencial en algunas plantas incluyendo a todas las monocotiledóneas.

Carbón activado. Se utiliza en el medio de cultivo para adsorber compuestos indeseados, para eliminar los reguladores de crecimiento en los subcultivos y puede disminuir la oxidación de compuestos fenólicos, lo que podría disminuir la necrosis de los explantes. Además en algunas especies puede promover la supervivencia de los explantes, la organogénesis, el crecimiento de los brotes, el desarrollo de raíces y podría disminuir la formación de tejido calloso (Pan y Van Staden, 1998; Thomas, 2008).

Reguladores del crecimiento. Para estimular la división y elongación celular, al medio de cultivo se le añaden reguladores del crecimiento. Se definen como compuestos sintéticos con actividad similar a las hormonas vegetales. Los reguladores del crecimiento afectan el crecimiento y la diferenciación del tejido (Gratton y Fay, 1990; Radice, 2010). El efecto de las hormonas vegetales naturales y de los reguladores del crecimiento no son específicos en el crecimiento y desarrollo y las respuestas de las células, tejidos y órganos *in vitro* pueden variar dependiendo las condiciones del cultivo, el tipo de explante y el genotipo (Gaspar *et al.*, 1996).

Los reguladores de crecimiento más utilizados en CTV son las citocininas y las auxinas. Las auxinas controlan la elongación celular en las plantas, estimulan la elongación de brotes y la producción de raíces (Goldstein, 2000; Paunescu, 2009), concentraciones altas de citocininas pueden suprimir la morfogénesis (Smith, 2000). Las citocininas promueven la proliferación celular, mantienen el crecimiento de tejidos vegetales y son responsables de la formación de órganos como brotes y yemas axilares (Paunescu, 2009; Radice, 2010). La diferenciación de brotes, raíces o ambos está regulada por el balance de auxina/citocinina (Radice, 2010).

Para las plantas suculentas Gratton y Fay (1990) mencionan que las combinaciones de reguladores utilizadas comúnmente son de 1 a 10 mg/L de N-6 Bencilaminopurina (BAP) con 0.1 a 0.5 mg/L de ácido α -naftalen acético (ANA). En algunas ocasiones sólo se hace uso de citocininas.

BAP es la citocinina que se usa más comúnmente para la producción de brotes axilares, porque la mayoría de las especies responden bien ante este regulador (George *et al.*, 2008;

Pence, 2010). Este regulador ha sido utilizado con éxito para la inducción de brotes múltiples en varias suculentas (Osorio y Mata, 2005; Arce-Montoya, *et al.*, 2006; Bettaieb *et al.*, 2008).

La kinetina (KIN) fue la primer citocinina que se descubrió, fue aislada en el laboratorio de Skoog y por ella se le dio el nombre al grupo de las citocininas (George *et al.*, 2008). La KIN ha sido efectiva en la propagación de diferentes suculentas, por ejemplo especies del género *Mammillaria* (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007).

Tidiazuron o TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea), es una citocinina potente que fue descubierta como defoliante de algodón (Arndt *et al.*, 1976). El TDZ por si solo puede sustituir el uso de una auxina (Murthy *et al.*, 1998). Ha sido utilizado con éxito desde 1982 para la formación de brotes adventicios y axilares y generalmente se utiliza en bajas concentraciones. En algunas plantas, el TDZ induce más brotes adventicios y axilares que otras citocininas tipo adenina como el BA y la KIN (Gaspar *et al.*, 1996), en algunos casos la formación de brotes es mucho mayor, por ejemplo en el caso del clavel y la rosa (Lu, 1993). Sin embargo, los brotes inducidos por TDZ tienden a no elongarse lo suficiente y son susceptibles a hiperhidratarse cuando hay subcultivos repetidos con la presencia de este regulador (Gaspar *et al.*, 1996). El TDZ se ha utilizado para inducir la morfogénesis y embriogénesis somática de varias especies leñosas y algunas suculentas como *Yucca aloifolia* (Atta-Alla y Van Staden, 1997) y *Furcraea mactophylla* (Martínez y Pacheco, 2006).

Propagación *in vitro*

Uno de los fines del CTV es la propagación o la multiplicación vegetal. Las plantas pueden regenerarse gracias al principio de totipotencialidad. La totipotencia o totipotencialidad es una característica de las células cigóticas que les permite diferenciarse en cualquier tipo de células o estructuras incluyendo organismos completos (Radice, 2010).

El proceso de regeneración de plántulas completas comprende tres fases: 1) Adquisición de la competencia. Es cuando las células adquieren la capacidad de responder al estímulo organogénico durante la fase de desdiferenciación; 2) Fase de inducción. Cuando las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento; y 3) Fase de realización. La célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (De Klerk *et al.*, 1997).

La producción de nuevas plántulas se puede lograr por tres vías: 1) Organogénesis directa: hay formación de órganos y elongación de brotes axilares por la activación de yemas preexistentes y/o proliferación de brotes adventicios a partir de tejido nuevo (*de novo*); 2) Organogénesis indirecta: primero se forma un tejido calloso o estructuras no organizadas y a partir de este los brotes u otros órganos; y, 3) Embriogénesis somática: obtención de embriones sin el uso de gametos (De Klerk *et al.*, 1997; George *et al.*, 2008; Radice, 2010).

El éxito del cultivo *in vitro* es dependiente del explante, individuo, especie, medio de cultivo y reguladores del crecimiento. Existe muchas formulaciones para el medio de cultivo, pero si no se tiene información previa de la especie a utilizar se recomienda usar algún medio de cultivo probado para varias especies (Smith, 2000). Uno de las formulaciones del medio de cultivo más usadas es Murashige y Skoog (MS) descrito en 1962. En este medio de cultivo crecen la mayoría de las células vegetales (Goldstein, 2000).

Organogénesis directa

La organogénesis directa es la principal vía de regeneración utilizada para la propagación de especies, y su propósito es la producción de órganos nuevos tales como brotes axilares, adventicios y raíces (De Klerk *et al.*, 1997; George *et al.*, 2008; Radice, 2010). Los explantes más comunes que se utilizan para lograr la organogénesis son meristemos apicales, brotes o yemas, nodos, raíces aisladas y embriones (George *et al.*, 2008).

Los brotes se obtienen al estimular las yemas preexistentes (brotes axilares) o a partir de tejido *de novo* donde no existían yemas, por ejemplo de hojas, pecíolo, pétalos, raíces o embriones (brotes adventicios). Los dos tipos de brotes se desarrollan principalmente por medio de la adición de reguladores del crecimiento. En ocasiones sólo se puede saber si los brotes son axilares o adventicios con pruebas histológicas para detectar su origen (George *et al.*, 2008).

Los factores que pueden afectar la organogénesis son el genotipo, las condiciones químicas (concentración salina, reguladores del crecimiento, antibióticos, agar y atmósfera gaseosa), las condiciones físicas (temperatura, humedad relativa y luz) y el explante (condiciones de la planta madre, tipo y tamaño del explante, genética, edad fisiológica) (Radice, 2010).

Micropropagación

La micropropagación es un proceso de propagación *in vitro* para producir clones de genotipos seleccionados, comprende desde la selección del tejido hasta la aclimatación del individuo a condiciones ambientales. En general, la micropropagación pretende producir plantas masivamente a un precio competitivo (Debergh y Zimmeraman, 1991; Roca y Mroginski, 1991; De Klerk *et al.*, 1997; George *et al.*, 2008).

La micropropagación tiene más ventajas sobre el cultivo convencional, entre las que destacan: hay una producción más rápida y masiva de plántulas libres de patógenos, se puede iniciar a partir de poco material vegetal lo que es muy conveniente para especies en peligro de extinción, hay producción de clones lo que hace posible elegir plantas con las mejores características para seguirlas produciendo, se pueden producir plántulas con más brotes axilares lo cual podría ser atractivo para plantas ornamentales, entre otras (Smith, 2000; George *et al.*, 2008).

Entre las desventajas destacan, los costos iniciales son más elevados que en el cultivo convencional, debido a la necesidad de equipo especial para el cultivo (Fay, 1992; Pence, 2010), pero a largo plazo, el costo por plántula llega a ser mucho menor porque se generan mayor cantidad de plántulas que en el cultivo convencional y se necesita de una menor cantidad de espacio para su producción. Otra desventaja de la micropropagación son los problemas que hay que superar, como por ejemplo la contaminación, la oxidación y necrosis de algunos explantes, etc. (Goldstein, 2000; George *et al.*, 2008). Una última desventaja que hay que resaltar es que no se cuenta con protocolos para la micropropagación de todas las especies y todas responden de una manera distinta, por lo que hay establecer la metodología de micropropagación para cada especie en particular (Pence, 2010).

La micropropagación se divide en cinco fases según varios autores (Debergh y Zimmeraman, 1991; George *et al.*, 2008):

Fase 0. Selección de la planta madre. Es la selección de la planta a partir de la cual se va a obtener el explante. Esta fase es una de las más importantes pues puede determinar el éxito del cultivo. Se debe seleccionar una planta saludable y posteriormente darle un adecuado almacenamiento y pretratamiento para evitar fuentes de contaminación (George *et al.*, 2008). Los factores que hay que tomar en cuenta para la selección del explante son: la edad, la

temporada del año, el tamaño, la calidad de la planta y el objetivo del trabajo (Smith, 2000; Mederos-Molina y Varela, 2001).

Fase 1. Establecimiento de cultivo aséptico. Consiste en eliminar los microorganismos del tejido. Para lograrlo se debe desinfectar superficialmente el tejido vegetal por medio de diferentes sustancias desinfectantes que varían en concentración y tiempo de exposición dependiendo el tipo de tejido (Goldstein, 2000; Sarasan *et al.*, 2006). Esta etapa podría ser difícil de alcanzar para algunas plantas, en especial las que provienen de campo (Smith, 2000). Los agentes desinfectantes más comunes son hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones de 5 a 20% durante 1 a 60 minutos, etanol al 70% durante 30 segundos a 2 minutos y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) del 3 al 12% durante 5 a 15 minutos (Skirvin *et al.*, 1999; Goldstein, 2000). En ocasiones es necesario utilizar antibióticos y fungicidas (Arce-Montoya, 2007), estos se deben usar únicamente en las primeras etapas del cultivo pues podrían afectar la respuesta organogénica (Yepes y Aldwinckle, 1994).

Fase 2. Multiplicación de propágulos adecuados. El objetivo de esta fase es la producción de plántulas o propágulos que cuando sean extraídos del medio de cultivo sean capaces de desarrollarse en plantas completas. Como se mencionó anteriormente, existen varios tipos de cultivo, pero para esta fase se utiliza con más frecuencia el cultivo de yemas apicales o laterales o de nodos, ya que en esta sección del tejido hay zonas meristemáticas y es más probable que haya brotación a partir de ellas. La multiplicación puede lograrse a través de la formación de brotes axilares o adventicios, así como por la formación de embriones somáticos (George *et al.*, 2008). El éxito de esta fase depende del medio de cultivo elegido y de los reguladores del crecimiento. Comúnmente se necesitan altas concentraciones de citocininas para promover la brotación múltiple y para romper la dominancia apical (George *et al.*, 2008; Olmos *et al.*, 2010). La dominancia apical es cuando las yemas laterales tienden a permanecer inactivas mientras la yema apical continúe creciendo (Bernardi, 1999), ésta también puede romperse causando un daño en el meristemo apical.

Fase 3. Elongación y enraizamiento de los brotes. Una vez que se obtienen los brotes se deben preparar para que puedan sobrevivir en condiciones ambientales y para que sean capaces de llevar a cabo la fotosíntesis sin una fuente artificial de carbohidratos. Esta fase incluye la elongación de los brotes y el enraizamiento. La elongación de brotes se hace para que los brotes tengan un tamaño adecuado para ser trasplantados a suelo, la longitud de los brotes es diferente en cada especie, las plantas con brotes más largos son más fáciles de separar para

desarrollar después su raíz (George *et al.*, 2008). En ocasiones la adición de citocininas en la fase previa, puede inhibir la formación de raíces, por lo que los brotes deben ser trasplantados a otros medios para que puedan producir raíces. El enraizamiento se puede lograr disminuyendo la concentración de reguladores del crecimiento, aumentando la concentración de auxinas en el medio de cultivo, por medio de subcultivos a medio de cultivo ausentes de reguladores del crecimiento (Gratton y Fay, 1990; Fay, 1994; George *et al.*, 2008; Pence, 2010), varios reportes señalan que el carbón activado promueve el desarrollo de los brotes y su enraizamiento (Thomas, 2008). En ocasiones el enraizamiento puede llevarse a cabo en el suelo para bajar los costos del cultivo, pero este no es posible en todas las especies (George *et al.*, 2008).

Fase 4. Transferencia *ex vitro*. Consiste en transferir los explantes de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Esta fase es importante pues podría llevar a pérdidas significativas, esto porque las hojas provenientes de cultivo *in vitro* pudieran tener una alterada composición en las ceras cuticulares y porque los estomas pueden ser atípicos e incapaces de cerrarse por completo en condiciones de baja humedad, lo que hace que las plantas pierdan humedad ocasionando su muerte (George *et al.*, 2008).

Problemas en el CTV

Existen métodos establecidos para el cultivo de tejidos, pero cada especie es diferente y podría responder diferente a cada una de las etapas del cultivo (Pence, 2010). La técnica es dependiente de procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, lo que produce problemas particulares en cada situación (Bairu y Kane, 2011). Existen diversos obstáculos en el cultivo *in vitro*, a continuación se describen los más comunes.

Los problemas pueden comenzar con la colecta. En algunos casos los explantes poseen periodos cortos de viabilidad o son difíciles de colectar porque se pueden encontrar en lugares remotos (Sarasan *et al.*, 2006; Pence, 2010). Especialmente, en especies en riesgo hay que tener mayor cuidado pues muchas veces se cuenta con poco material y hay que colectarlo directamente en campo (Sarasan *et al.*, 2006).

Un problema mayor es la contaminación tanto exógena como endógena. Puede ser introducida con el explante o por manipulación en el laboratorio y se puede expresar de inmediato o puede permanecer latente por algún período de tiempo (Leifert y Cassells, 2001).

En la micropropagación se producen clones y no se mantiene la diversidad genética, la cual es importante en la conservación (Fay, 1992). Los cambios e inestabilidad genética pueden ocurrir dependiendo el tiempo de cultivo, la especie y los reguladores del crecimiento (Bairu y Kane, 2011), esto hace que las plantas generadas en la micropropagación no sean propicias para la reintroducción. Para proyectos de restauración se deben hacer estudios genéticos para tener material adecuado para la restauración (Pence, 2010).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos (Azofeifa, 2009), la necrosis de los brotes, el crecimiento anormal de los tejidos como callos o tumores, la limitación de enraizamiento por posible aumento o disminución en los compuestos fenólicos (Bairu y Kane, 2011) son otros problemas comunes dentro del CTV. La oxidación y posterior necrosis puede ser ocasionada por el estrés oxidativo que sufren las células al ser cultivadas, el problema también ser porque a la hora de cortar el explante, este libera al medio de cultivo exudados oscuros que son una mezcla de sustancias fenólicas como respuesta ante el daño. Los problemas de oxidación se pueden resolver con el uso de antioxidantes en el medio de cultivo, tales como, carbón activado, ácido ascórbico o polyvinylpyrrolidone (PVP), entre otros (Azofeifa, 2009).

Otros problemas importantes que pueden ocurrir son, la recalcitrancia, la hiperhidratación y la variación somaclonal, Estos fenómenos pueden ser dependientes al genotipo o al ambiente. Muchas de estas malformaciones podrían ser causadas por el estrés oxidativo. Estrés oxidativo se define como un desbalance en los antioxidantes, lo cual causa daño en las células (Cassells y Curry, 2001).

La recalcitrancia se refiere la pérdida de potencial organogénico o de desarrollo de los tejidos (Olmos *et al.*, 2010). Se puede dar desde las semillas, éstas se vuelven recalcitrantes cuando pierden su viabilidad y se da principalmente cuando son sometidas a procesos de desecación. Los embriones de las semillas recalcitrantes no entran en el período de desarrollo y son incapaces de tolerar la desecación. A los tejidos se les conoce como recalcitrantes cuando pierden la capacidad de regeneración y nunca forman órganos nuevos (George *et al.*, 2008).

La hiperhidratación del tejido ocurre por la acumulación excesiva de agua en las células. Se reconoce porque las hojas adquieren una apariencia vítrea, translúcida, y se rompen con facilidad. Este fenómeno puede ser reversible pero en la mayoría de los casos es irreversible (Kevers *et al.*, 2004). La principal consecuencia de la hiperhidratación es una baja o nula supervivencia de las plántulas durante la aclimatación *ex vitro*, debido a un problema en la función de los estomas, además de que estos brotes rara vez sacan raíces (Cassells y Curry

2001; Kevers *et al.*, 2004). El estrés al que se someten los explantes en el cultivo *in vitro*, los cortes a los tejidos, los reguladores del crecimiento, la concentración y tipo de agente solidificante, el estrés hídrico, una alta concentración de sales, una deficiencia de algunos minerales, los niveles de etileno en los contenedores, la luz, la temperatura, la genética del individuo y los niveles endógenos de fitohormonas, son factores que contribuyen a la hiperhidratación (Gaspar *et al.*, 1996; Cassells y Curry 2001; Kevers *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Olmos *et al.*, 2010). Para disminuir el riesgo de hiperhidratación se debe manipular la composición del medio de cultivo, en especial de los reguladores del crecimiento y el tipo y concentración del agar, también se puede modificar el diseño del contenedor para facilitar el intercambio gaseoso (Ziv, 1991; Lu, 1993; Smith y Spomer, 1995; Cassells y Curry 2001; Ivanova, 2011).

La variación somaclonal se refiere a los cambios mutagénicos que puede producir el explante al ser establecido o en la etapa de inducción. Es producida porque las células tienen un alto estrés al ser cultivadas (Cardone *et al.*, 2010), puede aparecer cuando hay subcultivos continuos, tratamientos con altas concentraciones de reguladores del crecimiento y otros aditivos incluidos en el medio de cultivo, así como cuando hay una fase de callo previa a la regeneración. La variación somaclonal es un problema en especial cuando se pretende introducir las plantas a campo, o cuando se quiere obtener clones de líneas cultivadas específicas (Sararan *et al.*, 2006). Los cambios mutagénicos pueden ser irreversibles cuando son genéticos o pueden ser reversibles y no heredables y a estos se les conoce como epigenéticos (Cardone *et al.*, 2010). Para disminuir la posibilidad de variación somaclonal se recomienda utilizar la menor concentración posible de reguladores del crecimiento y subcultivar lo menos posible en tratamientos con reguladores.

Por último, un obstáculo importante puede ocurrir durante la aclimatación. Las plantas producidas *in vitro* tienen un retraso en el desarrollo de la cutícula y estomas abiertos permanentemente, esto se debe a que cuando están en condiciones *in vitro* siempre se encuentran con niveles altos de humedad y baja intensidad luminosa. Estos factores hacen que exista una alta tasa de transpiración lo que puede ocasionar una rápida pérdida de humedad, cuando se trasladan a condiciones *ex vitro*, y por tanto hay una baja tasa de supervivencia (George *et al.*, 2008; Mroginski, 2010; Pence, 2010).

Cultivo *in vitro* de *Beaucarnea*

El crecimiento de las especies del género *Beaucarnea* en general es lento y en algunas especies es difícil encontrar semillas (Contreras *et al.*, 2008), por lo que recurrir a métodos de CTV para propagar plantas del género es una buena alternativa. Existen algunos trabajos que han logrado la propagación de especies de la familia.

Samyn (1993) cultivó ápices de 3 mm de plántulas de *B. recurvata* germinadas en suelo. Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo Quoirin *et al.*, (1997) adicionado con una concentración de 4.4 μM de BAP. Como resultado obtuvo en promedio entre 3 y 4 brotes por explante. Los brotes se subcultivaron en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de ANA, en todos los casos se obtuvo enraizamiento, pero en el medio de cultivo adicionado con ANA el número de raíces fue mayor.

Sajeva *et al.* (1994) cultivaron secciones transversales de tallos de plántulas de *B. recurvata* en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con concentraciones entre 0.4 y 44 μM de BA y obtuvieron un promedio de 6.7 brotes por explante. Los brotes se cultivaron en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de ANA con lo que se logró la formación de raíces.

Osorio y Mata (2005) lograron la micropropagación de *B. recurvata* y *B. gracilis* a través de la formación de brotes múltiples por vía organogénesis directa. Como explantes utilizaron secciones longitudinales de tallos de plántulas y tallos completos de plántulas que habían sido germinadas *in vitro*. Los explantes se sembraron en medio de cultivo MS adicionado con BAP (0, 1, 3 y 5 mg/L). Los explantes que formaron el mayor promedio de brotes fueron las secciones longitudinales de los tallos, estos explantes formaron mayor número de brotes pues al hacer un corte en medio de los meristemas apicales se libera la dominancia apical y con esto se activan las yemas axilares. La concentración más efectiva para ambas especies fue la de 5 mg/L de BAP, *B. recurvata* tuvo un promedio de 11.1 brotes por explante y *B. gracilis* 8.2. El enraizamiento se logró con éxito cuando los brotes se sembraron en medio de cultivo MS con 1 g/L de carbón activado.

Bettaieb *et al.*, (2008) también lograron la propagación de *B. recurvata*. Utilizaron como fuente de explante yemas apicales de 5 mm de brotes axilares de plantas de 10 años. Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo MS adicionado con BAP (0, 0.1 y 1 mg/L) en combinación con IBA (0, 0.5 y 5 mg/L). Obtuvieron brotes múltiples por organogénesis directa.

La concentración más efectiva fue 1 mg/L de BA con 0.5 mg/L de IBA, en este tratamiento se indujo un promedio de 6 brotes por explante. El enraizamiento de los brotes se alcanzó con éxito al utilizar 5 mg/L de IBA con 1.76 μ M de β -ciclodextrina.

El tratamiento por pulsos se ha utilizado con éxito en algunas difíciles de propagar. No existen reportes acerca de la propagación *in vitro* por medio de pulsos de especies de *Beaucarnea*, ni de ninguna especie de la subfamilia Nolinoidea. Tampoco se encontraron trabajos donde propagaran suculentas con pulsos de citocininas. Pero, Ramírez-Malagón *et al.*, 2008, lograron la propagación de *Agave tequilana* con pulsos temporales de diferentes concentraciones de la auxina ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), los explantes fueron sometidos a pulsos durante 1, 3 y 6 días. Después de 60 días en la fase de elongación, reportaron un promedio de 12 brotes por explante en el tratamiento adicionado con 6.8 μ M con un tiempo de exposición de 3 días. Además de las suculentas algunas especies leñosas como *Pinus strobus* y *P. resinosa* se lograron micropropagar por medio de tratamientos por pulsos de citocininas (George *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

La especie *Beaucarnea compacta* es poco conocida por su distribución restringida y porque se describió recientemente. No se encuentra dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 debido a que actualmente se está llevando a cabo la metodología para incluirla, pero debido a su microendemismo y a que es altamente saqueada con fines comerciales y ornamentales se considera que se clasificará en la categoría de peligro de extinción. *B. purpusii* se encuentra catalogada como especie en peligro de extinción ya que, al igual que *B. compacta*, tiene una distribución restringida, es altamente saqueada y además sus inflorescencias son saqueadas en época navideña para usarlas como arbolitos de navidad. Aunado a esto existe muy poca información de ambas especies y no se ha trabajado mucho con ellas. Por estas razones es importante generar estrategias para la conservación y aprovechamiento de ambas especies para prevenir su extinción. Las técnicas de cultivo *in vitro* tienen un papel importante en la conservación *ex situ* de especies amenazadas pues a partir de estas técnicas es posible generar plantas completas a partir de poco material vegetal. Anteriormente solamente *B. recurvata* y *B. gracilis* habían sido propagadas mediante cultivo *in vitro* y este es el primer trabajo que logra micropropagar a *B. compacta* y *B. purpusii*. Se buscó promover la brotación múltiple de los explantes mediante organogénesis directa con el fin de incrementar el material vegetal y posteriormente individualizarlos para que puedan ser utilizados en un futuro en invernaderos, jardines botánicos o como alternativa para su comercialización legal.

HIPÓTESIS

1. Los porcentajes de germinación de semillas de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii* serán altos y similares, tal y como se ha observado en otras especies del género.
2. Las citocininas inducirán la formación de brotes múltiples a través de organogénesis directa a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *B. compacta* y *B. purpusii* sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido.
3. Las secciones longitudinales de tallos de plántulas de ambas especies sembrados en medio de cultivo líquido adicionado con altas concentraciones de citocininas durante períodos cortos de tiempo formarán mayor número de brotes que los sembrados en medio de cultivo semi-sólido.
4. Se inducirá la formación de raíces de los brotes obtenidos en medio de cultivo MS adicionado con diferentes concentraciones de carbón activado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii*.

Objetivos particulares

1. Determinar el índice de germinación de semillas de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii* en medio de cultivo MS.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BA), kinetina (KIN) y tidiazuron (TDZ) sobre secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii* cultivados en medio de cultivo MS semi-sólido.
3. Evaluar el efecto de altas concentraciones de bencilaminopurina y tidiazuron por medio de tratamiento por pulsos de 6, 24, 48 y 96 h sobre secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii* cultivados en medio MS líquido.
4. Evaluar el efecto del medio de cultivo MS con su concentración completa y a la mitad de su concentración y de diferentes concentraciones de carbón activado en el desarrollo de raíces de los brotes obtenidos *in vitro*.

METODOLOGÍA

Recolecta de material biológico

Las semillas de *Beaucarnea compacta* se colectaron en noviembre del 2010 en el municipio de Xichu, en la Sierra Gorda en el estado de Guanajuato. Las semillas de *B. purpusii* se colectaron en octubre del 2010 en Caltepec ubicado en la intersección de los estados de Puebla y Oaxaca. Las semillas fueron separadas del fruto, lavadas y almacenadas en frascos de vidrio.



Figura 2. Ejemplares adultos en su hábitat natural (zona de recolecta). A) *B. compacta*, B) *B. purpusii*.

Germinación

Desinfección superficial de las semillas

La desinfección superficial de las semillas de las dos especies de *Beaucarnea* se realizó siguiendo la metodología propuesta por Osorio y Mata (2005), la cual se describe a continuación:

Se lavaron las semillas con agua corriente y detergente comercial en agitación constante durante 30 min. Posteriormente se sumergieron en una solución fungicida (Captan al 3%) durante 24 h. Luego, se enjuagaron en agua esterilizada y sumergieron en siguientes soluciones: peróxido de hidrógeno al 10% por diez min; alcohol etílico 70% por un min.; solución de hipoclorito comercial al 30% con dos gotas de detergente líquido Salvo® durante 30 min. Finalmente se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar.

Siembra de semillas

Se sembraron cinco semillas por frasco de vidrio de 120 ml, se realizaron 20 repeticiones para un total de 100 semillas de cada especie. Cada frasco contenía 30 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) Basal Medium w/ Vitamins Prod No. M519 (PhytoTechnology Laboratories®) adicionado con 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar Plan TC Prod No. A296 (PhytoTechnology Laboratories®).

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 20 min. Todos los frascos 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.

Las semillas se monitorearon diariamente durante 45 días para verificar que no existiera contaminación y para registrar el porcentaje de germinación. Se realizó una curva de germinación utilizando el porcentaje acumulado de semillas germinadas durante 45 días. Se consideró como semilla germinada cuando la radícula comenzó a emerger (Ranal y García, 2006).

Fase de inducción

Medio de cultivo MS semi-sólido

Cuando las plántulas tenían una talla mayor a un centímetro de base y después de dos meses de haberlas sembrado, se procedió a la fase de inducción organogénica. Las plántulas se extrajeron de su frasco y se les cortaron las hojas y las raíces y se dividieron longitudinalmente en dos secciones con el fin de romper la dominancia apical. Cada sección se consideró un explante.

Se sembraron dos explantes por frasco de forma aleatoria. Cada frasco contenía 30 ml de medio basal MS adicionado con diferentes concentraciones de citocininas. Los explantes de *B. purpusii* fueron sembrados en medio de cultivo adicionado con BA, KIN (0, 1, 3 y 5 mg/L) y TDZ (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L). En el caso de *B. compacta* solamente se utilizó BA (0, 3 y 5 mg/L) porque se contaba con poco material vegetal.

Se realizó un segundo experimento con explantes de *B. purpusii* empleando los mismos tratamientos de citocinina pero con una mayor concentración de agar (8 g/L) con el fin de evitar la hiperhidratación de los brotes. Los frascos se incubaron en la cámara de crecimiento por un periodo de 30 días.

Crecimiento de brotes adventicios en medio de cultivo semi-sólido

A partir de explantes de *B. purpusii* sembrados en tratamientos adicionados con TDZ se registró la formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes formados previamente. Se separó una muestra de brotes de cada tratamiento de TDZ. Se seleccionaron brotes entre 1 y 3 mm de alto y se sembraron en medio de cultivo MS adicionado con 0, 0.5 y 1 g/L de carbón activado y en medio de cultivo MS a la mitad de su concentración (MS50) con las mismas concentraciones de carbón. Se obtuvo un total de seis tratamientos con nueve repeticiones cada uno (162 brotes). Se midió la altura inicial de los brotes (mm) y se hicieron mediciones del incremento de la altura a los 15 y 30 días del cultivo, con el fin de determinar el tratamiento más efectivo para el crecimiento de los brotes.

Tratamientos por pulsos en medio de cultivo MS líquido

En los siguientes tratamientos únicamente se utilizó *B. purpusii* debido a la falta de material vegetal de *B. compacta*. Se utilizaron secciones longitudinales de las plántulas como explantes de la misma forma que para el medio de cultivo semi-sólido. Se sembraron en matraces con 250 ml conteniendo 200 ml de medio de cultivo MS líquido adicionado con diferentes concentraciones de BA (25, 50 y 100 mg/L) y TDZ (5, 10 y 30 mg/L) y el tratamiento control (sin citocininas). Los matraces se colocaron en una mesa de agitación orbital a 120 rpm con diferentes tiempos de exposición, durante 6, 24, 48 y 96 h. Se obtuvo un total de 28 tratamientos (Tabla 1) con ocho repeticiones cada uno y dos explantes por frasco (448 explantes).

Tabla 1. Tratamientos con pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempos de exposición en medio de cultivo MS líquido sobre secciones longitudinales de plántulas *Beaucarnea purpusii*

Tiempo (h)	Regulador/ concentración (mg/L)	
	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)
6	0	0
	25	5
	50	10
	100	30
24	0	0
	25	5
	50	10
	100	30
48	0	0
	25	5
	50	10
	100	30
96	0	0
	25	5
	50	10
	100	30

Fase de elongación

Terminado el período de inducción de los explantes en medio de cultivo semi-sólido (30 días) y líquido (6, 24, 48 o 96 h.), se trasplantaron a medio de cultivo MS semi-sólido sin reguladores del crecimiento y adicionado con 1 g/L de carbón activado y 8 g/L de agar para que se desarrollaran las respuestas inducidas. Se registró la aparición de brotes a partir de los explantes y se subcultivaron cada 30 días durante tres meses.

Los brotes formados a partir de los explantes que ya tenían forma definida se individualizaron para promover su crecimiento, ya que de esta forma se elimina la competencia por el espacio con los otros brotes. Al finalizar los tres meses de subcultivo ya se habían formado brotes definidos en todos los tratamientos y se procedió a la etapa de enraizamiento.

Fase de enraizamiento

Para promover el desarrollo de las raíces se eligieron 60 brotes de algunos tratamientos de al menos 0.5 cm de ancho de base y mayores a 5 cm de altura. Se sembraron en tubos de

ensaye de 25 x 200 mm conteniendo 20 ml de medio de cultivo MS semi-sólido. Se utilizaron seis tratamientos diferentes que incluyeron: medio de cultivo MS adicionado con 0, 0.5 y 1 g/L de carbón activado y medio de cultivo MS50 con las mismas concentraciones de carbón. Se registró el porcentaje de plántulas con formación de raíces a los 15, 30 y 45 días.

Fase de aclimatación

Una vez transcurridos los 45 días del registro de las raíces, las plántulas con raíces se sacaron de los tubos y se lavaron con agua corriente para quitar los restos del medio de cultivo. Las plántulas se sembraron en charolas de plástico que contenían una mezcla de tierra negra, lombicomposta, composta y tepecil (1:1:1:1 v/v) y se asperjaron con fungicida (Captan® 3 g/L). Las charolas se dejaron en condiciones de invernadero y se regaron dos veces por semana dependiendo su grado de humedad. Se monitoreó la supervivencia final de las plántulas a los dos meses para las plántulas de *B. purpusii* y al mes para las plántulas de *B. compacta*.

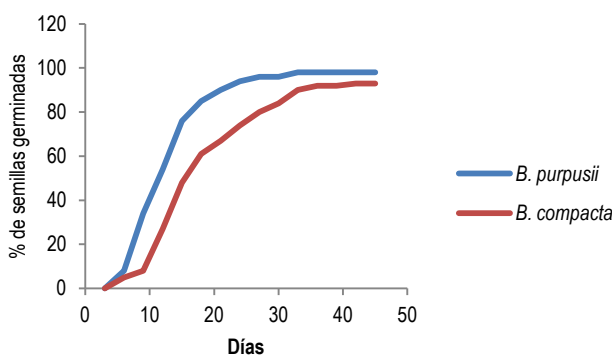
Pruebas estadísticas

Se midió el número de brotes totales, normales e hiperhidratados por explante y por explante con respuesta y se les aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el programa de estadística Sigma Plot. Las medias estadísticamente diferentes se analizaron con la prueba de comparación de medias LSD con un nivel de significancia <0.05. De la misma manera, para el análisis estadístico de los datos registrados sobre el incremento real de altura (mm) de los brotes adventicios formados a partir de hojas, se aplicó ANOVA y las medias estadísticamente diferentes se analizaron con la prueba de comparación de medias LSD.

RESULTADOS

Germinación

La germinación de las semillas de ambas especies comenzó al sexto día y continuó hasta el 40 aproximadamente, momento en el cual ya se había alcanzado el máximo de semillas germinadas. *B. purpusii* tuvo un porcentaje final de germinación del 98%, a los 15 días el 80% de las semillas habían germinado. El porcentaje de germinación de *B. compacta* fue ligeramente menor (93%) y el proceso fue un poco más lento, ya que a los 15 días se tenía un porcentaje del 50% (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *B. purpusii* y de *B. compacta* sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido durante 45 días.

Fase de inducción de *Beaucarnea purpusii* en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar

Supervivencia de los explantes

Los explantes sembrados en medio de cultivo semi-sólido tuvieron diferentes porcentajes de supervivencia dependiendo del tratamiento utilizado. La principal causa de la pérdida de explantes fue la oxidación, la cual posiblemente fue ocasionada por el daño provocado en el explante al hacer los cortes longitudinales. El explante comenzaba a oscurecerse desde las orillas y en ocasiones se oxidaba por completo, lo que posteriormente provocaba su necrosis (Figura 3a), este proceso comenzó desde el primer mes de la siembra. Las otras dos causas de la pérdida de explantes fueron la hiperhidratación y la contaminación. Cuando los explantes se hiperhidrataban adquirían una apariencia traslúcida, vítrea y se tornaban de color verde claro

(Figura 3b). La contaminación ocurrió por algún error en la manipulación del material experimental al momento de la siembra, pero se registró en pocos casos (Tabla 2).

La supervivencia de los explantes registrada en el tratamiento control fue del 54.17%. De manera general, y englobando a los tratamientos de las diferentes citocininas utilizadas, se obtuvo que los explantes sembrados en medio de cultivo adicionado con BA presentaron una supervivencia total del 47.9%, con KIN fue del 52.1% y con TDZ del 79%.

Dentro de los tres tratamientos adicionados con BA, la mayor supervivencia de explantes se registró en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA, con un total del 56.25%, la cual fue muy similar a la del tratamiento control. Seguido por el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA y la mayor pérdida de explantes se registró en el tratamiento adicionado con 3 mg/L de BA (Tabla 2). La mayoría de los explantes de este grupo se perdieron por oxidación.

En los tratamientos adicionados con KIN la mayor supervivencia se registró en el tratamiento adicionado con 5 mg/L, con un total del 62.5%, seguido por el tratamiento adicionado con 1 mg/L y, al igual que en el caso de BA, en el tratamiento adicionado con 3 mg/L se registró la menor supervivencia de explantes (Tabla 2). La mayor pérdida de los explantes en este grupo fue causada por hiperhidratación y fue mayor que en los demás tratamientos, probablemente la KIN promovió la hiperhidratación de los explantes.

Los explantes sembrados en medio de cultivo adicionado con 1 mg/L de TDZ tuvieron la supervivencia más alta de todos los tratamientos (93.8%), lo que significa que solamente se perdió un explante. En el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L, solamente se perdieron dos explantes, y en el tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ fue donde se registró la menor supervivencia del grupo y fue similar a la del grupo control (Tabla 2). En este grupo la principal causa de la pérdida de los explantes fue la oxidación, y en pocos casos la hiperhidratación causó la pérdida de los explantes.

Estos resultados nos indican que, BA y KIN no tuvieron un efecto positivo en la supervivencia de los explantes, pues los porcentajes de supervivencia fueron similares al tratamiento control e incluso en algunos casos fueron menores. Los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con TDZ presentaron mayor supervivencia que los demás tratamientos, lo que nos sugiere que este regulador tuvo un efecto positivo en su supervivencia, al menos en las concentraciones de 0.1 y 1 mg/L.

Tabla 2. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y 0.6% de agar

Tratamiento (mg/L)	Explantos con respuesta / n	Supervivencia (%)	Pérdida de explantes oxd./hiper./cont. (%)		
Control	26/48	54.17	35.42	4.17	6.25
BA					
1	9/16	56.25	31.25	0.0	6.25
3	6/16	37.5	56.25	0.0	6.25
5	8/16	50	31.25	6.25	12.5
KIN					
1	8/16	50	12.5	18.75	18.75
3	7/16	43.75	18.75	25	12.5
5	10/16	62.5	6.5	31.3	0.0
TDZ					
0.1	14/16	87.5	12.5	0.0	0.0
0.5	9/16	56.3	37.5	6.25	0.0
1	15/16	93.8	0.0	6.25	0.0

Oxd: oxidación. Hiper: hiperhidratación. Cont: contaminación

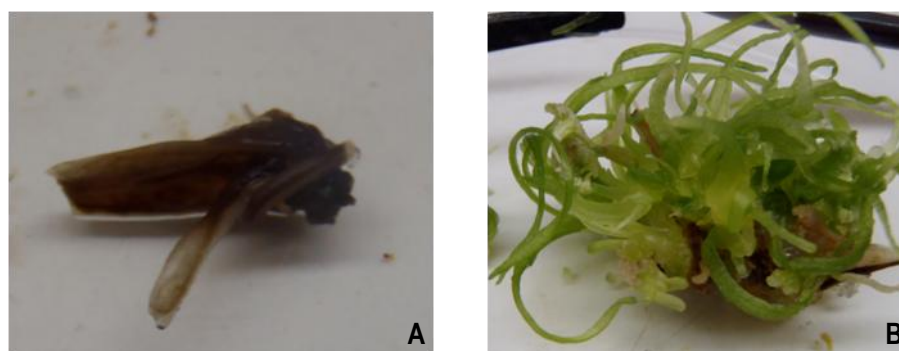


Figura 3. Secciones longitudinales de *Beaucarnea purpusii* (explantes) necrosadas A) Necrosis por oxidación de un explante proveniente de un tratamiento por pulsos de 100 mg/L de BA durante 24 h. B) Necrosis por hiperhidratación de un explante cultivado en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con una concentración de agar del 0.6% y con 1 mg/L de TDZ.

Respuestas morfogénicas

En la mayoría de los tratamientos, la respuesta morfogénica obtenida fue la formación de brotes múltiples. El proceso de formación de los brotes fue similar en todos los tratamientos. Al finalizar los primeros 30 días del período de inducción, los explantes comenzaron a responder, algunos se veían más hinchados que al inicio, pero aún no se observaba claramente alguna

respuesta morfológica, otros de ellos formaron unos nódulos amarillentos, de los cuales posteriormente se desarrollaron brotes, en una tercera porción de los explantes ya se podían distinguir los primeros brotes y otros de los explantes comenzaron a hiperhidratarse (Figura 4). En los tres meses posteriores en medio de cultivo con carbón activado (fase de elongación), los brotes se consolidaron y se definieron, en algunos casos también hubo formación de raíces.

Los brotes formados fueron tanto axilares como adventicios, ya que éstos crecieron prácticamente a partir de todo el explante, incluyendo en su base de forma radial (brotes adventicios), en la base axilar de la hoja (brotes axilares), así como también sobre brotes que habían formado previamente (Figura 5).

Los brotes formados a partir de los explantes fueron de tres tipos: a) hiperhidratados, brotes de apariencia vítrea (Figura 6a); b) normales, es decir, aquellos brotes de apariencia semejante al explante original (Figura 6b) y c) brotes adventicios formados a partir de hojas de brotes formados previamente, estos brotes se contabilizaron dentro del grupo de los normales.

La formación de brotes hiperhidratados se registró desde el primer mes de la siembra, los explantes comenzaban a hiperhidratarse y formaban brotes en su mayoría hiperhidratados, aunque también se formaron brotes normales a partir de estos explantes. Los brotes hiperhidratados se tornaban color verde claro y tenían una apariencia vítrea, los brotes no fueron viables, no desarrollaron raíz y en la mayoría de los casos se tornaron color café y murieron.

Los brotes normales comenzaron a formarse desde el primer mes de la siembra y se formaron a partir de los explantes sembrados con las tres citocininas empleadas (Figura 7). Conforme los brotes normales se fueron consolidando, se individualizaron en los subcultivos mensuales para promover su crecimiento y facilitar el desarrollo de los más pequeños. La formación de los brotes adventicios a partir de hojas se explica con detalle más adelante.

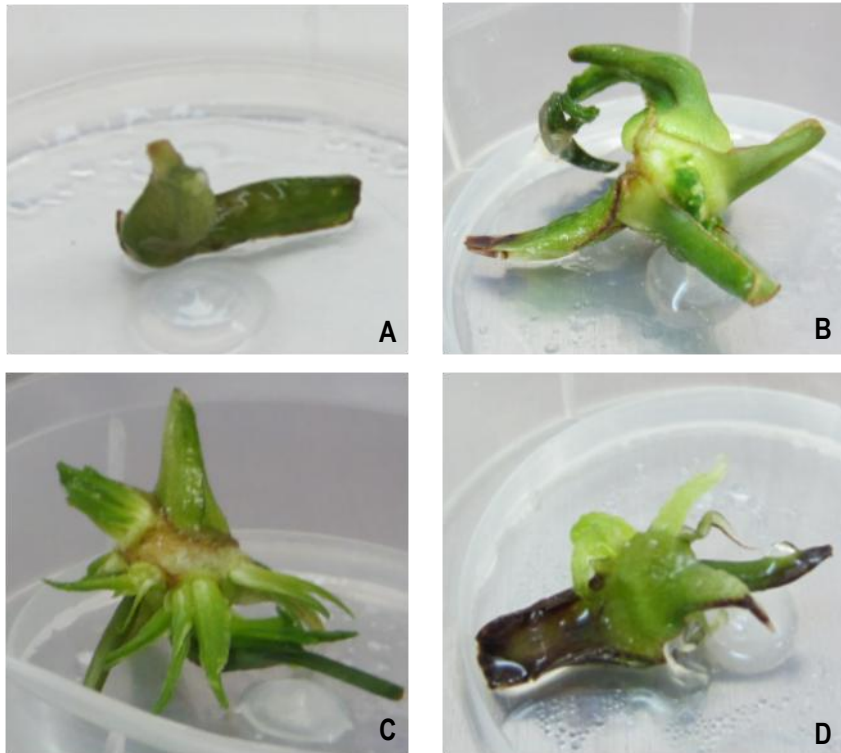


Figura 4. Respuestas de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* a los 30 días de la siembra sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y diferentes concentraciones de citocininas. A) Explante hinchado cultivado en un tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ. B) Explante con formación de nódulos amarillentos cultivado en un tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA. C) Explante con formación de primeros brotes cultivado en un tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ. D) Explante hiperhidratado sembrado en un tratamiento adicionado con 3 mg/L de KIN.

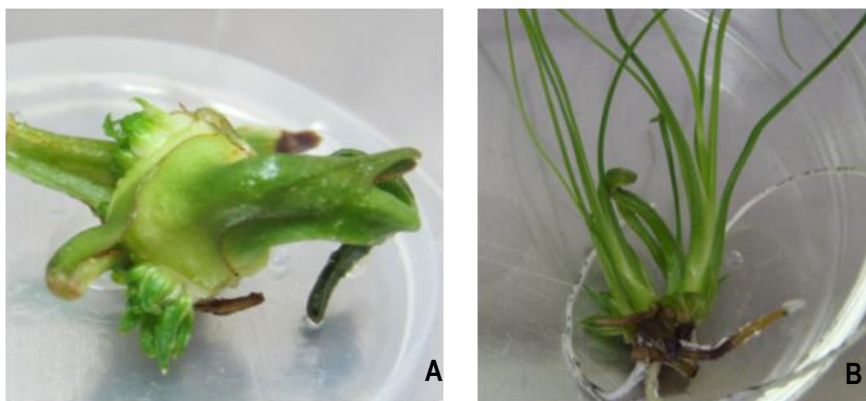


Figura 5. Origen de los brotes formados a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y diferentes concentraciones de citocininas. A) Brotes adventicios formados en la base del explante inducidos por un tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ B) Brotes axilares formados en la parte apical del explante inducidos por un tratamiento adicionado con 5 mg/L de KIN.

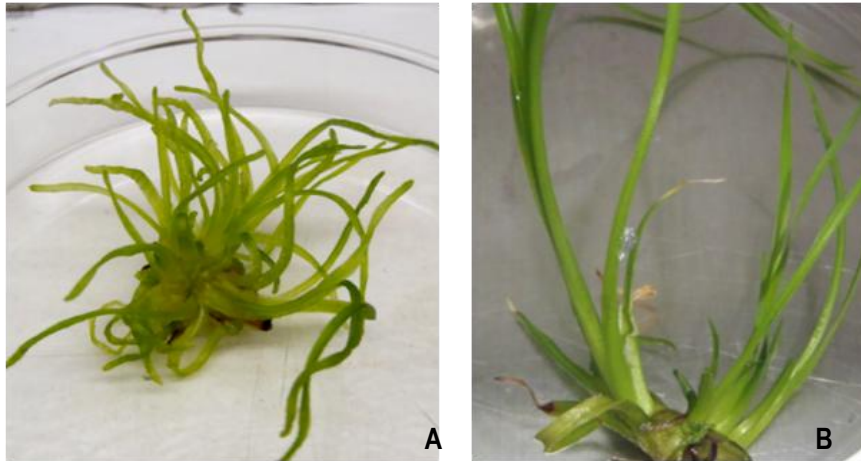


Figura 6. Respuestas morfológicas de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* cultivadas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de citocininas. A) Brotes hiperhidratados inducidos por el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA. B) Brotes normales inducidos en el tratamiento control.

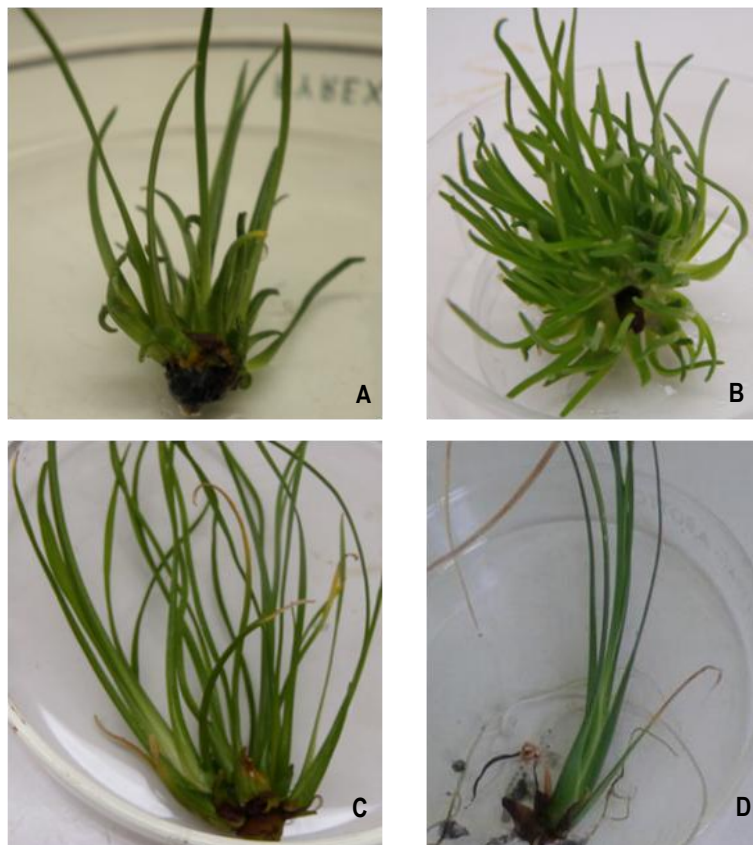


Figura 7. Formación de brotes normales de *Beaucarnea purpusii* al tercer mes de su siembra cultivados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y diferentes concentraciones de citocininas. A) 1 mg/L de BA. B) 0.5 mg/L de TDZ C) 5 mg/L KIN. D) Tratamiento control.

Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes

Los brotes normales, a diferencia de los hiperhidratados, pueden desarrollarse en plántulas completas y se pueden aclimatar a condiciones de invernadero, por lo que para fines prácticos, se analizaron por separado. A partir del primer mes (fase de inducción) comenzó la formación de los brotes normales, y en los posteriores subcultivos, donde ya no se adicionaban las citocininas, continuo la formación de los brotes normales en la mayoría de los tratamientos (Gráfica 2).

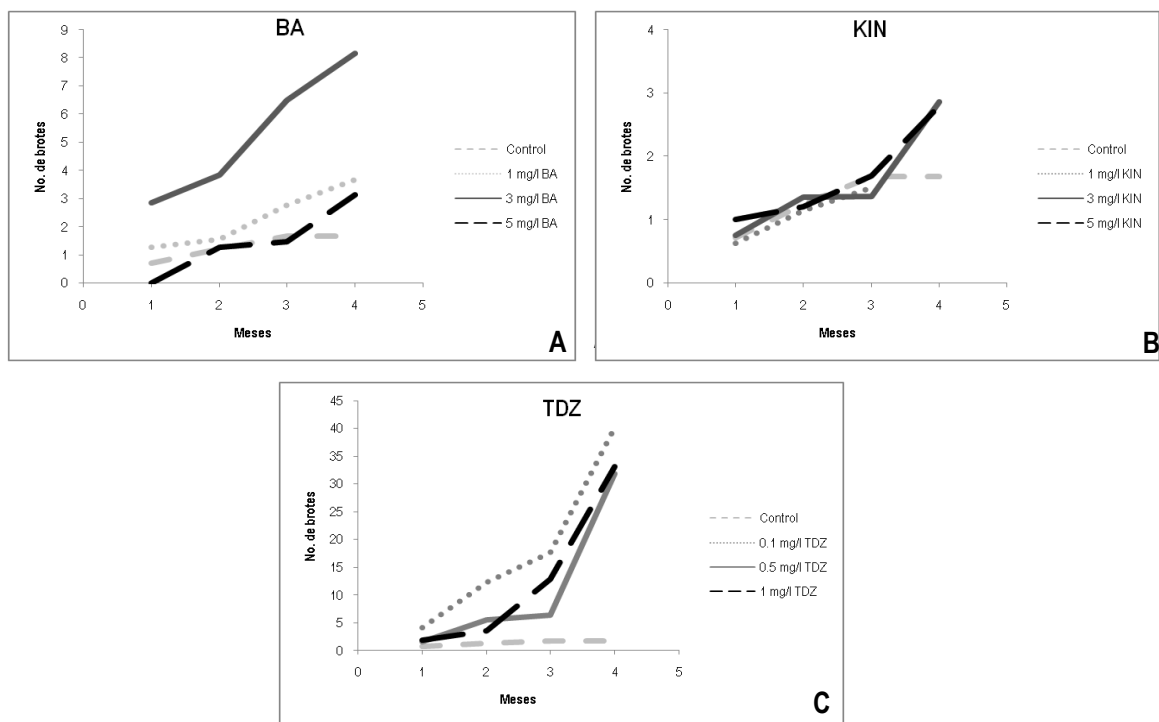
En la mayoría de los casos, los explantes sembrados en el tratamiento control únicamente regeneraron un solo brote, el cual posiblemente se formó porque el daño causado al meristemo al realizar los cortes longitudinales pudo haber activado alguna yema. Al tercer mes de la siembra se registró el mayor promedio de los brotes formados en el control y en el cuarto mes ya no hubo formación de brotes nuevos (Gráfica 2).

La formación de brotes normales registrada en los tratamientos adicionados con BA fue continua durante los cuatro meses del experimento (Gráfica 2). La formación de los brotes tuvo un comportamiento lineal, es decir, a mayor tiempo, mayor número de brotes, con la excepción del tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA, en el cual, no hubo incremento en el número de brotes normales en el cuarto mes (Gráfica 2).

La formación de brotes normales en los tratamientos adicionados con KIN fue dispareja, debido a que no todos los tratamientos tuvieron un comportamiento igual a lo largo de los cuatro meses de la siembra, algunos tratamientos indujeron mayor formación de brotes entre el segundo y tercer mes y los otros entre el tercero y el cuarto (Gráfica 2). A partir del segundo y tercer mes, la mayoría de los brotes ya estaban consolidados y se podían separar fácilmente de los otros. En el tratamiento adicionado con 1 mg/L de KIN, el mayor número de brotes se registró al tercer mes de la siembra, no se muestran los datos del cuarto mes pues los brotes se perdieron por contaminación. Los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L indujeron la formación de brotes normales durante los cuatro meses de la siembra, y entre en tercer y cuarto mes fue cuando se registró la mayor formación de brotes (Gráfica 2).

Los brotes normales inducidos por el TDZ se formaron a lo largo de los cuatro meses del experimento. En todos los tratamientos, el promedio de los brotes normales se incrementó considerablemente entre el tercer y cuarto mes (Gráfica 2), esto fue por dos razones, primero porque en este periodo se formaron brotes adventicios a partir de hojas de brotes previamente

formados, por tanto, el promedio de los brotes incrementó; y la otra razón fue porque una característica del TDZ es que los brotes formados son compactos y crecen muy juntos entre ellos, por lo que al principio aún no estaban consolidados como brotes y no se podían contabilizar, al dividir los explantes en los subcultivos, los brotes que se habían comenzado a formar tuvieron más espacio y más tiempo para desarrollarse. En el último mes del experimento muchos de los brotes aún no estaban completamente consolidados y se observaron nuevas protuberancias de las cuales posteriormente se formaría otros brotes, por lo que con el paso del tiempo, el promedio seguramente sería mayor.



Gráfica 2. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de *Beaucarnea purpusii* sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar y diferentes concentraciones de citocininas. A) Tratamientos adicionados con BA. B) Tratamientos adicionados con KIN C) Tratamientos adicionados con TDZ.

Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento

Para el primer análisis de los datos se tomaron en cuenta los brotes totales, es decir, la suma de los brotes hiperhidratados y los normales formados a partir de los explantes totales (n=16). Como se observa en la gráfica 3, TDZ fue la citocinina que indujo el mayor número de brotes por explante, posteriormente BA, y por último KIN. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) fue posible establecer diferencia significativa en la formación de brotes totales ($p < 0.001$), así como de los hiperhidratados ($p < 0.001$) y los normales ($p < 0.001$).

Los tratamientos adicionados con TDZ fueron los únicos que presentaron diferencia significativa con los demás tratamientos (Tabla 3). El tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ fue el que indujo la mayor formación de brotes totales por explantes totales, con un promedio de 42.94 y la mayor parte de ellos eran normales. Seguido por el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ, el cual indujo un promedio de 35.19, y el promedio de brotes hiperhidratados fue el más bajo del grupo (Tabla 3). El tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ fue el que indujo la menor formación de brotes totales y normales del grupo (Tabla 3).

Tanto en los tratamientos adicionados con BA como con KIN, el promedio de brotes totales incrementó conforme se aumentó la concentración empleada (Tabla 3). Esto nos sugiere que existió un efecto directo entre la concentración del regulador y la formación de los brotes.

Los tratamientos adicionados con BA no presentaron diferencia estadística con los tratamientos adicionados con KIN ni con el control, aún así, el promedio de los brotes inducidos por BA fue mayor (Tabla 3). La única excepción fue en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA, el cual indujo 2.33 brotes, este promedio fue menor que el registrado en algunos tratamientos adicionados con KIN. El promedio de los brotes totales inducidos por los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L de BA fue similar entre ellos (Tabla 3); sin embargo, el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA indujo la mayor formación de brotes hiperhidratados del grupo, con un total de 3.14, además este promedio fue mayor al de los brotes normales registrados en este tratamiento. Por otro lado, la concentración de 3 mg/L de BA fue la que indujo el mayor número de brotes normales del grupo con un total de 3.26 (Tabla 3).

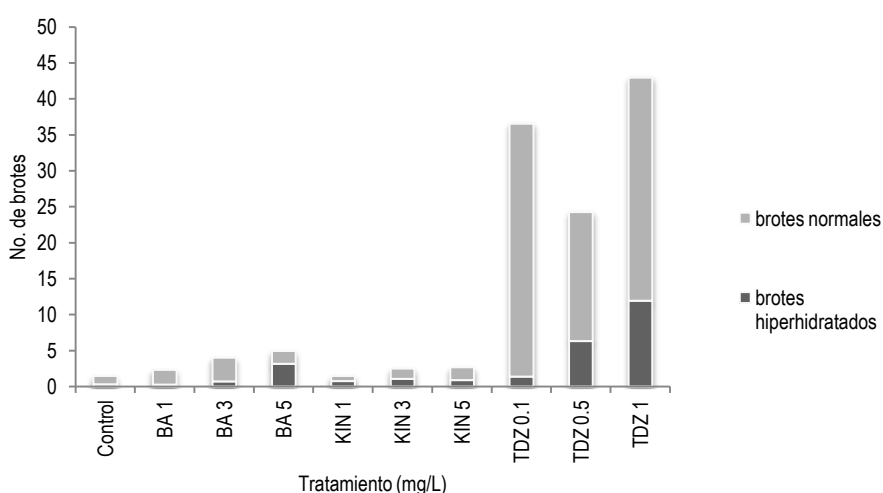
Dentro de los tratamientos adicionados con KIN, el tratamiento adicionado con 5 mg/L fue el que indujo la mayor formación de brotes totales, y la mayor parte de los brotes fueron normales (Gráfica 3). Los promedios de los brotes totales formados a partir de explantes sembrados con 3 y 5 mg/L de KIN fueron similares, pero la proporción de brotes normales e

hiperhidratados fue diferente; el tratamiento adicionado con 3 mg/L de KIN indujo mayor formación de brotes hiperhidratados del grupo, con un total de 1.07 (Tabla 3). El tratamiento adicionado con 1 mg/L de KIN, fue el que indujo la menor formación de brotes totales entre todos los tratamientos, incluso fue ligeramente menor que el promedio de brotes totales registrados en el tratamiento control (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii*

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes totales \pm DS
Control	1.47 \pm 2.21d	0.31 \pm 1.04c	1.14 \pm 1.88c
BA			
1	2.33 \pm 3.12d	0.27 \pm 0.70c	2.06 \pm 3.13c
3	4.0 \pm 5.78d	0.73 \pm 2.58c	3.26 \pm 5.51c
5	4.93 \pm 6.37d	3.14 \pm 3.28bc	1.78 \pm 3.66c
KIN			
1	1.46 \pm 1.66d	0.77 \pm 1.09c	0.69 \pm 1.65c
3	2.5 \pm 1.87d	1.07 \pm 1.49c	1.43 \pm 1.78c
5	2.62 \pm 3.42d	0.87 \pm 2.03c	1.78 \pm 3.66c
TDZ			
0.1	36.56 \pm 27.92ab	1.37 \pm 3.75c	35.19 \pm 28.46a
0.5	24.25 \pm 25.33c	6.31 \pm 11.02b	17.94 \pm 24.17b
1	42.94 \pm 23.30a	11.94 \pm 11.54a	31.00 \pm 23.47a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$).
D.S: Desviación estándar



Gráfica 3. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionados con citocininas y 0.6% de agar.

Análisis de formación de brotes por explante con respuesta por tratamiento

Debido a que a causa de la oxidación se perdieron alrededor del 50% de los explantes, los datos también se analizaron tomando en cuenta únicamente los explantes que respondieron, ya que la pérdida de los explantes pudo deberse a la manipulación, es decir, al momento de dividir la plántula en dos y no por el efecto directo del medio de cultivo o el tipo y concentración de citocinina empleada. Se analizó la suma de los brotes hiperhidratados y los normales, es decir, los brotes totales. Al analizar los datos fue posible establecer diferencia significativa entre la formación de brotes totales ($p < 0.001$), hiperhidratados ($p < 0.001$) y normales ($p < 0.001$). Al analizar los datos de esta forma, nuevamente TDZ fue la citocinina que indujo la mayor formación de brotes totales, seguido por BA y finalmente KIN (Gráfica 4).

El promedio de brotes totales por explante con respuesta inducidos por todos los tratamientos con TDZ fue similar entre ellos, fluctuando entre 40-45 brotes. Los explantes sembrados en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ fueron los que formaron mayor número de brotes totales entre todos los tratamientos. El tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ indujo el mayor promedio de brotes normales de entre todos los tratamientos, además el número de brotes hiperhidratados fue bajo en comparación con los otros tratamientos adicionados con TDZ, por lo tanto este tratamiento fue el más conveniente de este experimento para la inducción de brotes de *B. purpureus* (Tabla 4).

Al analizar solamente los explantes con respuesta, tampoco fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos adicionados con BA y los adicionados con KIN y el control (Tabla 4). El tratamiento adicionado con 3 mg/L de BA fue el que indujo la mayor formación de brotes totales del grupo, y también fue el que indujo la mayor formación de brotes normales (Tabla 4). La concentración de 5 mg/L indujo 8.5 brotes totales, pero la mayoría de ellos fueron hiperhidratados, y fue el tratamiento que indujo el menor promedio de brotes normales (Gráfica 4). En el otro extremo, la menor concentración de BA fue la que indujo la menor formación de brotes totales (Tabla 4).

Dentro de los tratamientos adicionados con KIN, la mayor formación de brotes totales del grupo se registró en el tratamiento adicionado con 5 mg/L de KIN, en este tratamiento también se registró la mayor formación de brotes hiperhidratados del grupo (Tabla 4). Por otro lado, el tratamiento adicionado con 3 mg/L de KIN fue el tratamiento que indujo el menor promedio de brotes hiperhidratados y el mayor promedio de brotes normales del grupo (Tabla 4). Entre mayor es la concentración de KIN mayor es la formación de brotes totales, sin embargo, no existió una

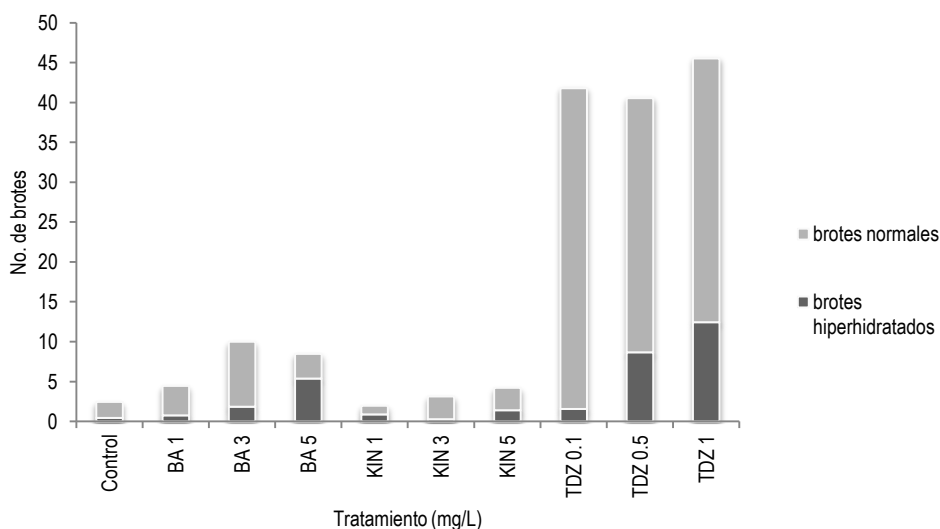
relación directa entre el aumento de la concentración y la mayor formación de brotes hiperhidratados y normales (Gráfica 4).

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales/ explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados/ explante con respuesta \pm DS	Promedio de brotes normales/ explante con respuesta \pm DS
Control	2.46 \pm 2.48b	0.46 \pm 1.3c	2 \pm 2.12c
BA			
1	4.44 \pm 2.83b	0.78 \pm 1.2c	3.66 \pm 3.28b
3	10 \pm 4.65b	1.83 \pm 4.02c	8.17 \pm 4.01b
5	8.5 \pm 6.41b	5.37 \pm 2.56bc	3.12 \pm 3.48b
KIN			
1	2 \pm 1.93b	0.87 \pm 1.36c	1.12 \pm 3.48b
3	3.14 \pm 1.68b	0.28 \pm 0.75c	2.86 \pm 3.72b
5	4.2 \pm 3.49b	1.4 \pm 2.46c	2.8 \pm 3.11b
TDZ			
0.1	41.78 \pm 25.77a	1.57 \pm 3.99c	40.21 \pm 26.77a
0.5	40.55 \pm 21.51a	8.66 \pm 12.52b	31.88 \pm 24.4a
1	45.53 \pm 21.49a	12.46 \pm 11.71a	33.06 \pm 22.70a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$).

D.S: Desviación estándar



Gráfica 4. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y 0.6% de agar.

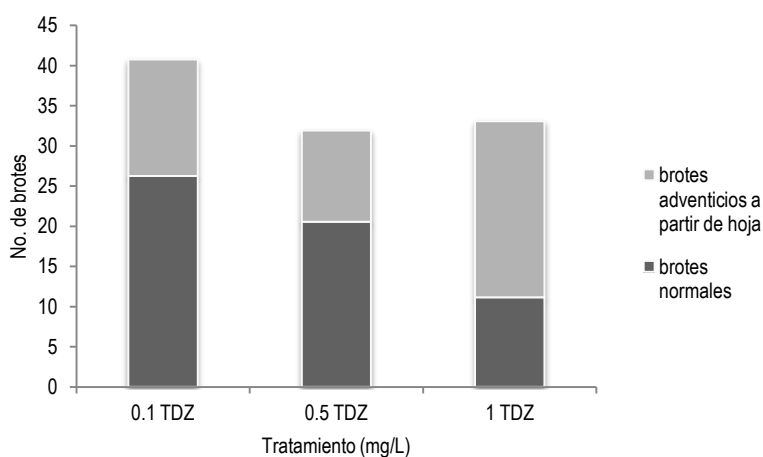
Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii*

Una respuesta destacable de los explantes sembrados en todos los tratamientos adicionados con TDZ, fue la formación de brotes adventicios a partir de las hojas de brotes previamente formados (Figura 8a). Estos brotes son adventicios porque se formaron a partir de las hojas, en la cuales no hay presencia de yemas.

Los brotes adventicios a partir de las hojas se contabilizaron como brotes normales debido a que al desarrollarse se formaban plántulas completas. En la gráfica 5 se muestran los promedios de brotes adventicios y de los normales por tratamiento.

La formación de estos brotes comenzó a partir del segundo mes de la siembra con la aparición de pequeños nódulos amarillentos en el haz de las hojas, en las orillas o en la parte central. Posteriormente, al tercer mes, estos nódulos se diferenciaban en brotes y si se separaban de las hojas y se ponían en contacto con el medio de cultivo, los brotes crecían y formaban plántulas completas (Figura 8d). La formación de los brotes adventicios continuó mes con mes, y si se hubiera proseguido con el registro de datos después de los cuatro meses, la formación de los brotes seguramente hubiera sido mayor.

En todos los tratamientos adicionados con TDZ hubo formación de brotes adventicios a partir de hojas. Al analizar por separado los brotes adventicios de los normales, se observa que al incrementar la concentración de TDZ en el medio de cultivo, la formación de brotes adventicios fue mayor y la formación de los brotes normales fue un poco menor (Gráfica 5).



Gráfica 5. Promedio de brotes normales y adventicios desarrollados a partir de hojas de brotes formados a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de TDZ y de agar al 0.6%.

Supervivencia

Como un experimento preliminar, se separó una muestra de brotes adventicios de las hojas provenientes de los tres tratamientos de TDZ, y se sembraron en diferentes medios de cultivo para medir su crecimiento en altura (Figura 8d). El rango de supervivencia de los brotes fue muy amplio dependiendo los tratamientos donde fueron sembrados y de su tratamiento de procedencia (Tabla 5).

Los brotes procedentes del tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ sembrados en el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado y los brotes procedentes del tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ sembrados en medio de cultivo MS50 adicionado con 1 g/L de carbón activado, tuvieron los mayores rangos de supervivencia entre todos los tratamientos; en ambos casos la supervivencia fue del 88.9%, es decir, sólo se perdió un brote. Al contrario, los brotes procedentes del tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ sembrados en medio de cultivo MS sin carbón activado y los procedentes del tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ sembrado en medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado, tuvieron una supervivencia de sólo brote (11.2%).

Se puede observar un efecto del tratamiento de procedencia en la supervivencia de los brotes, ya que los brotes que procedían de tratamientos adicionados con 0.1 mg/L de TDZ tuvieron una supervivencia entre el 11.1 y el 33.3%. En cambio, la supervivencia de los brotes procedentes de los tratamientos adicionados con 0.5 y 1 mg/L de TDZ tuvieron una supervivencia hasta del 88.9% (Tabla 5). Al parecer, el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ tuvo un efecto negativo en la supervivencia de los brotes.

El porcentaje de supervivencia de los brotes fue muy heterogéneo en todos los tratamientos y no se observó un efecto directo entre los tratamientos y la supervivencia (Tabla 5). La pérdida de los brotes pudo ser causada porque probablemente necesitaban desarrollarse más antes de ser separados de la planta madre, además la posición en que los brotes fueron sembrados también afectó su supervivencia, los brotes se sembraron en posición vertical con una porción de la planta madre en su base, probablemente la sección de la hoja impedía el paso de los nutrientes del medio de cultivo al brote. Cuando los brotes adventicios estaban en los tratamientos originales y estaban en contacto directo con el medio de cultivo, el desarrollo de los brotes fue continuo y no había pérdida de ellos.

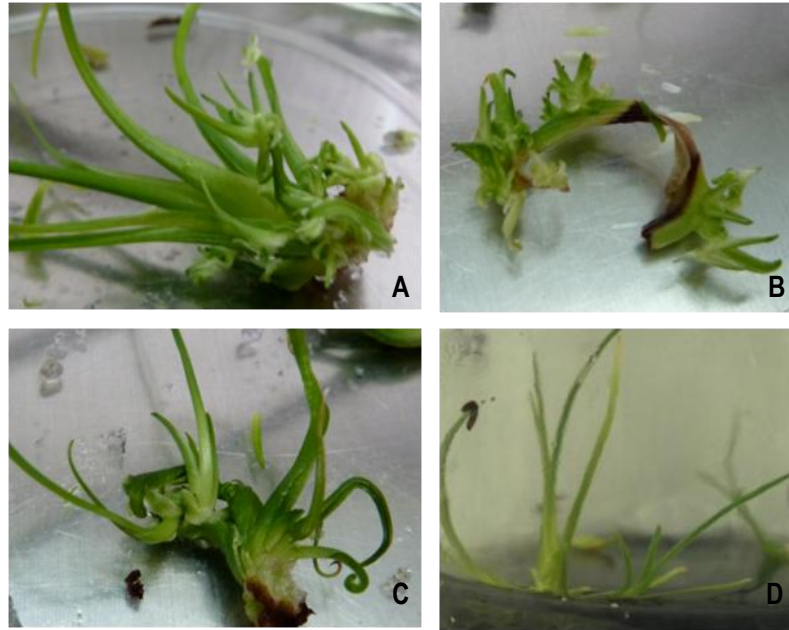


Figura 8. Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii* previamente formados en tratamientos adicionados con TDZ. A) Explante proveniente de un tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ. B) Hoja con brotes adventicios proveniente de un tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ. C) Hoja con brotes adventicios proveniente de un tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ. D) Brotes adventicios sembrados en medio semi-sólido MS adicionado con 1 g de carbón activado.

Análisis del efecto de los tratamientos en el crecimiento de los brotes adventicios formados a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii*

El crecimiento de los brotes pudo ser influido tanto por el tratamiento de procedencia como por el tratamiento en que se sembraron (Tabla 5). Al analizar los datos fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0.041$).

Los mayores incrementos en altura se registraron en los brotes que procedían de los tratamientos adicionados con 0.1 y 1 mg/L de TDZ, causalmente en estos tratamientos fue donde se registró el mayor número de brotes adventicios (Gráfica 5). Sin embargo, el tratamiento de procedencia no pareció tener un efecto muy marcado en el incremento de altura de los brotes, pues los resultados fueron heterogéneos entre todos los grupos.

Entre todos los tratamientos, los brotes que presentaron los mayores incrementos de altura fueron los que procedían del tratamiento adicionado con 1 mg/L de TDZ sembrados en el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado. Sin embargo, en este tratamiento solamente sobrevivió un brote, por lo que el promedio pudo haber variado si hubiera sobrevivido un mayor número de brotes. Posteriormente, los brotes procedentes del tratamiento adicionado

con 0.1 mg/L de TDZ sembrados en medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado tuvieron un incremento de altura de 17.66 mm (Tabla 5).

De manera general, los mayores incrementos en altura se registraron en el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado, y cuando no se adicionó carbón activado, el incremento de altura de los brotes fue menor, a excepción de los brotes procedentes del tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ sembrados en el medio de cultivo MS sin carbón activado, donde el incremento de altura fue uno de los mayores (Tabla 5). En algunos tratamientos se registró formación de nuevos brotes (Tabla 5). Estos brotes se separaron y no fueron contabilizados dentro de este experimento, porque se formaron días después.

Este experimento fue preliminar y se hizo para seguir el desarrollo de los brotes. Con estos datos se pudo verificar que los brotes crecieron y formaron raíces y posteriormente podrían ser aclimatados.

Tabla 5. Incremento de altura de brotes adventicios de *Beaucarnea purpusii* formados a partir de hojas de brotes previamente formados en tratamientos adicionados con TDZ, sembrados en diferentes tratamientos

Tratamiento de procedencia: regulador – concentración (mg)	Tratamiento: medio / carbón activado (g)	Supervivencia (%)	Incremento de altura real a los 30 días (mm.)	Brotes nuevos
TDZ - 0.1	MS/0	11.11	3bc	0
TDZ - 0.1	MS/0.5	22.22	9abc	0
TDZ - 0.1	MS/1	33.33	17.66ab	6
TDZ - 0.1	MS50/0	33.33	3bc	0
TDZ - 0.1	MS50/0.5	22.22	6.5abc	0
TDZ - 0.1	MS50/1	33.33	11ab	0
TDZ - 0.5	MS/0	66.66	10.16ab	0
TDZ - 0.5	MS/0.5	44.44	8abc	3
TDZ - 0.5	MS/1	88.88	7.62abc	4
TDZ - 0.5	MS50/0	33.33	0.66bc	0
TDZ - 0.5	MS50/0.5	77.77	3.71bc	0
TDZ - 0.5	MS50/1	44.44	2.5bc	0
TDZ - 1	MS/0	55.55	0.8c	3
TDZ - 1	MS/0.5	44.44	2.5bc	0
TDZ - 1	MS/1	11.11	22a	0
TDZ - 1	MS50/0	44.44	1.75bc	0
TDZ - 1	MS50/0.5	66.66	5bc	0
TDZ - 1	MS50/1	88.88	4bc	4

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$).

Cortes histológicos de brotes adventicios formados a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii*

Con el fin de determinar si los brotes obtenidos a partir de hojas de brotes formados previamente eran adventicios o si se trataba de otra estructura, por ejemplo, embriones somáticos, se realizaron cortes histológicos para determinar su origen. Se determinó que se trata de brotes adventicios porque nacen directamente de la hoja y no es un cuerpo separado como lo sería un embrión, esto se sabe porque hay una continuidad entre las células del parénquima del brote y de la hoja y no están separados por alguna epidermis (figura 9). Además, los haces vasculares de la hoja y del brote son continuos, en la figura 9 se observa una ligera discontinuidad de los haces entre el brote y la hoja, esto es porque el corte histológico no se realizó justo por el lugar de unión, pero aún así se puede observar que hay una conexión. Otra evidencia de que se trata de un brote y no un embrión somático es que los embriones tienen centros meristemáticos y tienen dos polos, el apical y el radicular, ninguna de estas estructuras se observó en los cortes histológicos (Figura 9).

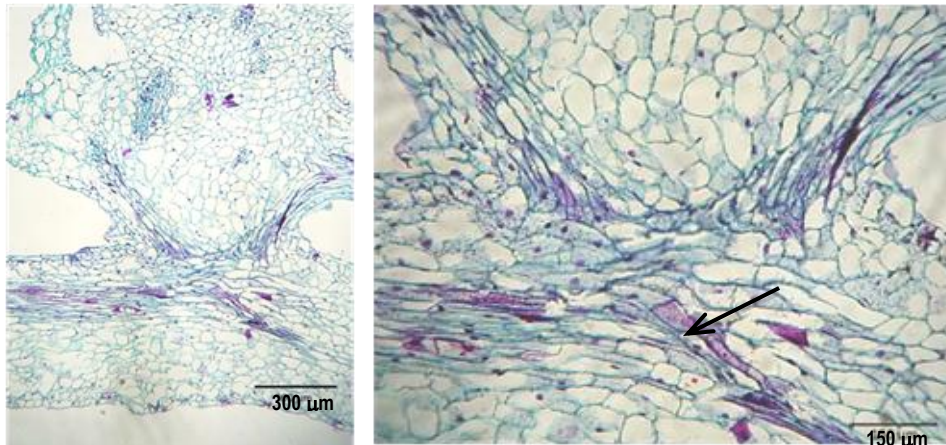


Figura 9. Corte histológico de un brote adventicio de *Beaucarnea purpusii* formado a partir de la hoja de un brote formado previamente en un tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ, se observa los haces vasculares (flecha). A) Microscopio estereoscópico (50x) B) Microscopio óptico (100x).

Fase de inducción de *Beaucarnea purpusii* en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar

Supervivencia de los explantes

Como se muestra en la tabla 6, la supervivencia de los explantes de *B. purpusii* varió dependiendo el tratamiento utilizado. Los explantes sembrados en el tratamiento control tuvieron una supervivencia del 62.5%. De manera global, agrupando los tratamientos con las diferentes citocininas, los explantes sembrados en medio de cultivo adicionado con BA tuvieron una supervivencia del 70.83%, con KIN fue del 62.5%, y con TDZ fueron los que presentaron mayor supervivencia, con el 81.25%. Estos datos nos indican que TDZ tuvo un efecto benéfico en la supervivencia de los explantes.

Dentro de los tratamientos adicionados con BA, los explantes sembrados en el tratamiento adicionado con 1 mg/L fueron los que presentaron la menor supervivencia, con total del 50%, la principal causa de la pérdida de los explantes en este tratamiento fue la oxidación. En los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L se perdieron tres explantes en cada uno de los tratamientos, la pérdida fue causada principalmente por oxidación e hiperhidratación (Tabla 6).

Los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con KIN, de manera general, presentaron los menores porcentajes de supervivencia (Tabla 6). La excepción fue el tratamiento adicionado con 5 mg/L de KIN, en el cual se registró una supervivencia del 87.5% de los explantes y fue, en conjunto con el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ, los que promovieron la supervivencia más alta de explantes. Los explantes sembrados en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de KIN tuvieron la menor supervivencia entre todos los tratamientos (43.75%). La principal causa de la muerte de los explantes en este grupo fue la oxidación.

Dentro de los tratamientos adicionados con TDZ, el adicionado con 0.1 mg/L de TDZ fue el que presentó la mayor supervivencia del grupo, y por otro lado, en el adicionado con 0.5 mg/L se registró la menor supervivencia del grupo (Tabla 6), en este tratamiento, el 18.75% de los explantes se perdió por contaminación causada por algún error en la metodología. Los tratamientos adicionados con 0.1 y 0.5 mg/L fueron los mejores para la supervivencia de los explantes, ya que en ambos casos solamente se perdió un explante por oxidación y no hubo pérdidas por hiperhidratación.

Al igual que en el primer experimento, la mayor supervivencia de los explantes se registró en los tratamientos adicionados con TDZ, lo que nuevamente nos indica que este

regulador tiene un efecto positivo en la supervivencia de los explantes de *B. purpusii*. En este segundo experimento se registró una mayor supervivencia de los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con BA y KIN y en el tratamiento control en comparación con el primero experimento.

Tabla 6. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y 0.8% de agar

Tratamiento (mg/L)	Explantos con respuesta / n	Supervivencia (%)	Pérdida de explantes oxd./hiper./cont. (%)		
Control	10/16	62.5	37.5	0.0	0.0
BA					
1	8/16	50	37.5	6.25	6.25
3	13/16	81.25	6.25	12.50	0.0
5	13/16	81.25	6.25	6.25	6.25
KIN					
1	7/16	43.75	43.8	12.50	0.0
3	9/16	56.25	18.75	0.0	25
5	14/16	87.5	12.5	0.0	0.0
TDZ					
0.1	14/16	87.5	6.25	0.0	6.25
0.5	12/16	75	6.25	0.0	18.75
1	13/16	81.25	18.75	0.0	0.0

Oxd: oxidación. Hiper: hiperhidratación. Cont: contaminación

Respuestas morfogénicas

Al igual que en el primer experimento, la respuesta morfogénica de los explantes fue la formación de brotes por medio de organogénesis directa. El proceso de formación de los brotes ocurrió de la misma forma que en el primer experimento. Es decir, el explante comenzó por engrosarse en los primeros 30 días de la siembra, en esta fase, en algunos de los explantes se observaban algunas protuberancias amarillas, en otros ya se distinguían los primeros brotes y otros de los explantes comenzaron a hiperhidratarse. En los meses posteriores de la etapa de elongación se comenzaron a distinguir los demás brotes y se consolidaron. En este experimento se registraron los mismos tipos de brotes, los brotes hiperhidratados, brotes normales y brotes adventicios a partir de hojas, todos por medio de organogénesis directa.

El proceso de formación de brotes hiperhidratados fue muy similar que en el primer experimento (ver experimento uno). Pero, el promedio de brotes hiperhidratados fue diferente (Gráfica 3 y 7).

Los brotes normales inducidos por las citocininas empleadas tuvieron características muy similares a los del primer experimento. La diferencia fue que en este segundo experimento, los brotes inducidos por el BA y la KIN estuvieron mejor definidos y era más fácil individualizarlos. Los brotes inducidos por el TDZ se desarrollaron más lento que en el primer experimento y el promedio de los brotes fue mucho menor (Tabla 6). La formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes se explica más adelante.

Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes

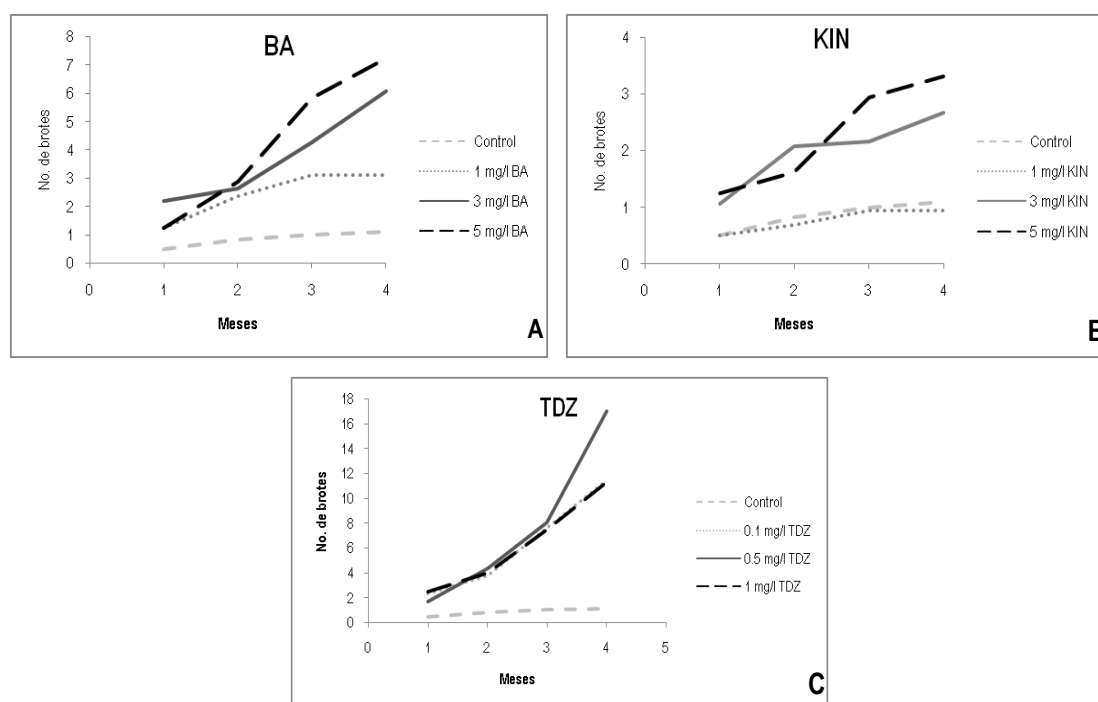
Al igual que en el primer experimento, donde la concentración de agar adicionada al medio de cultivo fue del 0.6%, se analizó la formación de brotes normales a lo largo de los cuatro meses del experimento. En la mayoría de los tratamientos la formación de los brotes continuó mes con mes (Gráfica 6).

La mayoría de los explantes sembrados en el tratamiento control formaron un solo brote y al tercer mes del cultivo ya se habían consolidado todos los brotes, y en el último mes no se registraron brotes nuevos (Gráfica 6). La formación de los brotes en los tratamientos adicionados con BA fue continua, excepto en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA, en el cual el promedio de brotes registrados al tercer mes fue muy similar al registrado al cuarto mes. En los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L de BA la formación de los brotes fue mayor en cada mes (Gráfica 6), es decir, la formación de los brotes tuvo un comportamiento lineal, lo que indica que hubo un efecto directo entre la concentración y la formación de los brotes normales.

La formación de brotes en los tratamientos adicionados con KIN fue dispareja, debido a que no se presentó un comportamiento igual en la formación de los brotes en los diferentes meses (Gráfica 6). Los explantes sembrados en el tratamiento adicionado con 1 mg/L de KIN se comportaron de manera similar a los sembrados en el tratamiento control, el promedio de los brotes normales registrados por mes fue muy similar en ambos tratamientos y al tercer mes del experimento ya se habían consolidado la mayor parte de los brotes. Los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L de KIN, formaron mayor número de brotes y la

formación de los brotes tuvo un comportamiento lineal (Gráfica 6). Al cuarto mes del experimento ya se había consolidado la mayoría de los brotes y muchos de ellos ya tenían raíz.

Los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con TDZ formaron brotes normales durante los cuatro meses del experimento. La formación de los brotes en los tratamientos adicionados con 0.1 y 1 mg/L de TDZ presentó un crecimiento con tendencia lineal. En cambio, en el tratamiento adicionado con 0.5 mg/L la tendencia de crecimiento fue exponencial (Gráfica 6), esto fue porque entre el tercer y cuarto mes de la siembra se formaron los brotes adventicios a partir de hojas, por lo tanto incrementó el promedio de brotes normales.



Gráfica 6. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de *B. purpusii* sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con una concentración de agar del 0.8% y con diferentes concentraciones de citocininas. A) Tratamientos adicionados con BA. B) Tratamientos adicionados con KIN C) Tratamientos adicionados con TDZ.

Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento

Al igual que en el primer experimento, se analizaron los datos tomando en cuenta los brotes totales, es decir, la suma de los brotes hiperhidratados más los brotes normales formados a partir de explantes totales (n=16). Al analizar los datos fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos en la formación de brotes totales, hiperhidratados y normales ($p < 0.001$) (Tabla 7).

En el tratamiento control solamente se registraron brotes normales y ninguno hiperhidratado, el promedio total fue de 0.69. Todos los tratamientos adicionados con citocininas indujeron mayor formación de brotes que el tratamiento control (Gráfica 7).

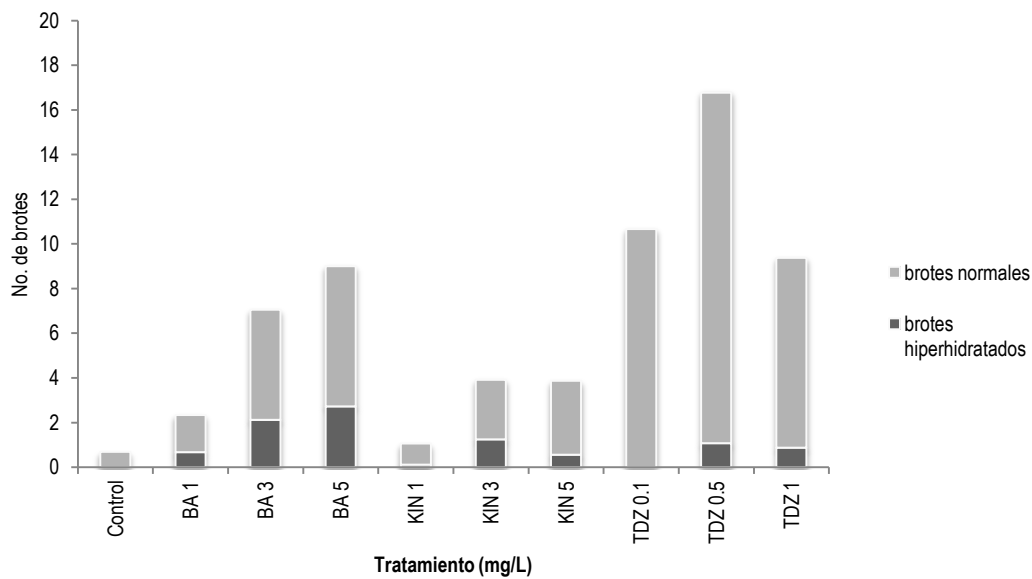
Los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con TDZ fueron los que formaron mayor número de brotes totales entre todos los tratamientos. Sin embargo, el promedio de los brotes inducidos por el TDZ fue considerablemente menor al promedio de los brotes inducidos por las mismas concentraciones de TDZ en el primer experimento, que fue cuando se adicionó 0.6% de agar (Tabla 4 y 7). El tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ fue el que indujo la mayor formación de brotes totales y normales de entre todos los tratamientos, además el promedio de los brotes hiperhidratados fue bajo (Tabla 7). El tratamiento adicionado con 0.1 mg/L indujo no se registraron brotes hiperhidratados, pero la formación de brotes normales fue algo menor. Los explantes sembrados en medio de cultivo adicionado con 1 mg/L fueron los que formaron el menor número de brotes totales y la formación de brotes hiperhidratados también fue baja (Tabla 7).

Todos los explantes sembrados en los tratamientos adicionados con BA formaron más brotes que los explantes sembrados en tratamientos adicionados con KIN y el control, pero no fue posible establecer diferencia significativa entre ellos. Al incrementar concentración de BA el promedio de los brotes totales también incrementó (Tabla 7). Los explantes sembrados en el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA formaron 9.0 brotes, y fue la concentración que indujo el mayor promedio de brotes hiperhidratados y normales (Gráfica 7).

El promedio de los brotes totales formados a partir de explantes sembrados en tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L de KIN fue muy similar entre ellos, pero en el tratamiento adicionado con 3 mg/L se registraron más brotes hiperhidratados que en el de 5 mg/L, y este último, fue el que indujo la mayor formación de brotes normales dentro del grupo de KIN (Tabla 7). El menor promedio de brotes totales se registró en los tratamientos adicionados con la menor concentración de KIN y fue muy similar al grupo control, pero a diferencia del tratamiento control, en el tratamiento con 1 mg/L se registraron brotes hiperhidratados (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii*

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes totales \pm DS
Control	0.69 \pm 0.60d	0.0 \pm 0.0c	0.69 \pm 0.60d
BA			
1	2.33 \pm 3.15d	0.67 \pm 1.59c	1.67 \pm 3.13d
3	7.06 \pm 5.55bc	2.12 \pm 2.85ab	4.93 \pm 5.03cd
5	9.00 \pm 6.50b	2.73 \pm 2.94a	6.27 \pm 6.64bcd
KIN			
1	1.06 \pm 1.48d	0.12 \pm 0.34c	0.94 \pm 1.53d
3	3.92 \pm 3.17cd	1.25 \pm 1.48bc	2.67 \pm 3.34d
5	3.87 \pm 5.15cd	0.56 \pm 1.55c	3.31 \pm 4.28d
TDZ			
0.1	10.67 \pm 8.38b	0.0 \pm 0.0c	10.67 \pm 8.38b
0.5	16.77 \pm 12.65a	1.08 \pm 2.90bc	15.69 \pm 12.58a
1	9.37 \pm 8.59b	0.87 \pm 2.09bc	8.50 \pm 9.05bc



Gráfica 7. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y agar al 0.8%.

Análisis de formación de brotes por explante con respuesta por tratamiento

En este experimento también se analizaron los datos tomando en cuenta solamente los explantes que respondieron debido a que nuevamente hubo una pérdida de material por oxidación, la cual fue probablemente causada por la manipulación. Se analizó la formación de brotes totales, es decir la suma de los brotes hiperhidratados y los normales. Al analizar los datos fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos en la formación de brotes totales ($p < 0.001$), hiperhidratados ($p = 0.035$) y normales ($p < 0.001$).

Al analizar sólo los explantes con respuesta se aprecia mejor que todos los tratamientos indujeron mayor número de brotes que el control, el cual indujo 1.1 brotes totales, y todos fueron normales (Gráfica 8).

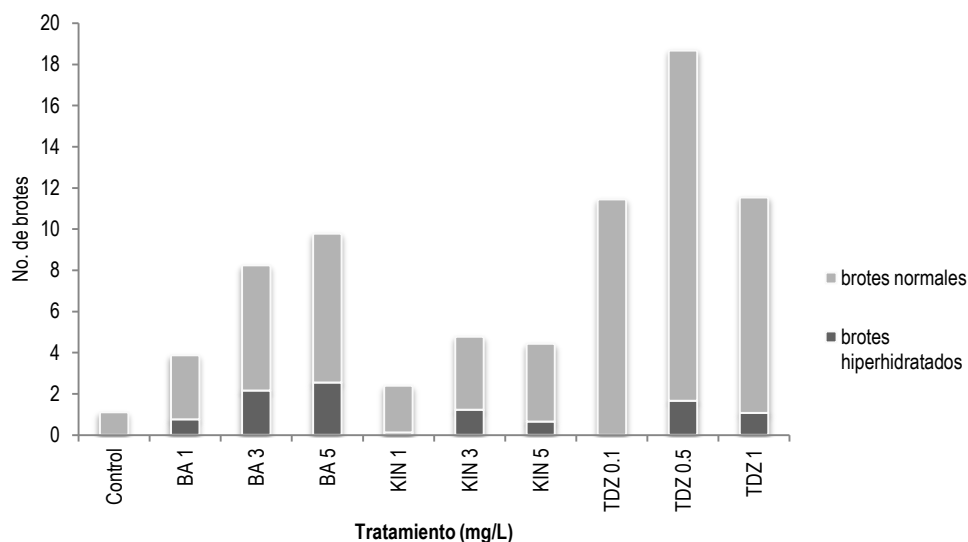
Los tratamientos adicionados con TDZ fueron los que indujeron el mayor promedio de brotes entre todos los tratamientos (Gráfica 8). El tratamiento adicionado con 0.5 mg/L de TDZ fue el que indujo la mayor formación de brotes totales y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Tabla 8), este tratamiento también fue el que indujo la mayor formación de brotes normales y la formación de brotes hiperhidratados fue baja, por esta razón, este tratamiento se consideró el más conveniente de este experimento. El promedio de brotes obtenidos a partir de explantes sembrados en los tratamientos adicionados con 0.1 y 1 mg/L de TDZ fue muy similar entre ellos, con un total de 11.43 y 11.54 brotes totales respectivamente y fueron estadísticamente iguales. El tratamiento adicionado con 1 mg/L indujo 1.07 brotes hiperhidratados y la mayoría fueron normales, mientras que en el tratamiento adicionado con 0.1 mg/L no se registró ningún brote hiperhidratado y todos fueron normales (Gráfica 8).

Dentro del grupo de BA, el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA fue el que indujo la mayor formación de brotes totales, hiperhidratados y normales (Tabla 8). El tratamiento adicionado con 1 mg/L de BA fue el que indujo la menor formación de brotes totales (Gráfica 8). Por tanto, hubo un efecto directo entre la concentración del BA y la formación de brotes.

Los brotes registrados en los tratamientos adicionados con KIN no presentaron diferencia significativa entre ellos ni con el control, pero es notorio un efecto de la KIN porque el promedio fue mayor (Gráfica 8). La concentración que indujo el mayor número de brotes totales en este grupo fue 3 mg/L, con un total de 4.78 brotes totales, y también fue el tratamiento que indujo el mayor número de brotes hiperhidratados (Tabla 8). En el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA se registró el mayor promedio de brotes normales del grupo de KIN (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de diferentes concentraciones de citocininas y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales/ explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes normales / explante con respuesta \pm DS
Control	1.1 \pm 0.32d	0.0 \pm 0.0b	1.1 \pm 0.32d
BA			
1	3.87 \pm 3.48cd	0.75 \pm 1.75ab	3.12 \pm 3.80d
3	8.23 \pm 5.36bc	2.15 \pm 2.85a	6.08 \pm 4.91cd
5	9.77 \pm 6.66bc	2.54 \pm 3.10a	7.23 \pm 6.62bc
KIN			
1	2.14 \pm 1.68d	0.12 \pm 0.34b	2.26 \pm 1.68d
3	4.78 \pm 3.03cd	1.22 \pm 1.30ab	3.55 \pm 3.43d
5	4.43 \pm 5.29cd	0.64 \pm 1.64b	3.78 \pm 4.39d
TDZ			
0.1	11.43 \pm 8.14b	0.0 \pm 0.0b	11.43 \pm 8.14b
0.5	18.17 \pm 12.12a	1.66 \pm 3.01ab	17.00 \pm 12.18a
1	11.54 \pm 8.08b	1.07 \pm 2.29ab	10.46 \pm 8.95bc

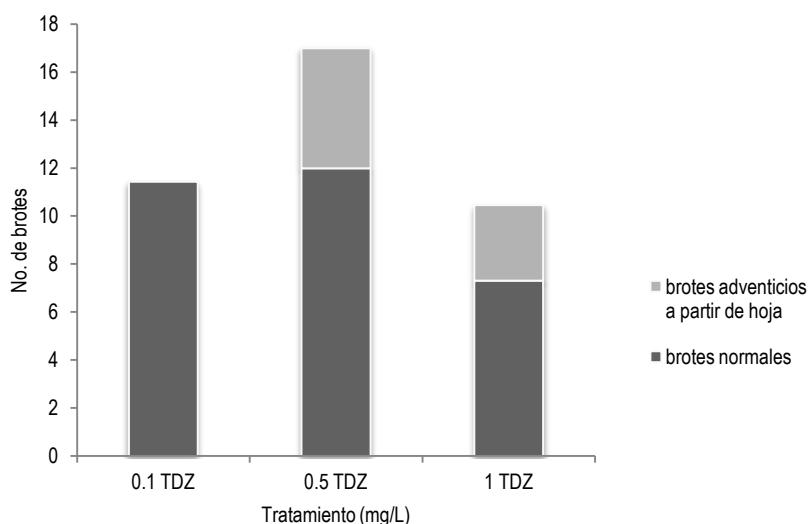


Gráfica 8. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta cultivados en diferentes tratamientos adicionados con citocininas y 0.8% de agar

Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii*

En este experimento también se registró la formación de brotes adventicios a partir de hojas, aunque en menor medida que en el primer experimento. Al igual que en el primer experimento, los brotes adventicios sólo se desarrollaron a partir de brotes formados en los tratamientos adicionados con TDZ.

Solamente se registraron brotes adventicios en los tratamientos adicionados con 0.5 y 1 mg/L de TDZ. En la gráfica 9, se muestra por separado el promedio de brotes normales y los adventicios a partir de hojas de brotes, en todos los casos la formación de brotes normales fue mayor a la de los brotes adventicios. En este experimento no se realizó ensayo de su crecimiento, los brotes continuaron su crecimiento en su medio original.



Gráfica 9. Promedio de brotes normales y adventicios desarrollados a partir de hojas de brotes formados a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* en medio de cultivo MS adicionado con diferentes concentraciones de TDZ y una concentración de agar del 0.8%

Fase de inducción de *Beaucarnea purpusii* en medio de cultivo líquido por tratamiento por pulsos

Supervivencia de los explantes

La supervivencia de los explantes expuestos a diferentes pulsos de BA y de TDZ fue diferente para cada tratamiento (Tabla 9). En general, la menor supervivencia entre todos los tratamientos se registró en los tratamientos control, los cuales de manera global, tuvieron una supervivencia del 31.25%. Los explantes expuestos a pulsos de BA tuvieron una supervivencia global del 58.33%, y la de los explantes sometidos a pulsos de TDZ fue del 68.23%.

Al igual que en los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido, la principal causa de la pérdida de los explantes fue la oxidación. La segunda causa de la pérdida de explantes fue la hiperhidratación y por último, la contaminación fue la otra causa de la pérdida de los explantes, pero en este experimento fue baja en casi todos los tratamientos.

La supervivencia más baja de los explantes sembrados en los tratamientos control fue de sólo dos explantes (12.5%) y fue en el tratamiento con un tiempo de exposición de 24 h. La mayor supervivencia en este grupo fue de siete explantes (43.75%), en el tratamiento con mayor tiempo de exposición (96 h.). La principal razón de la pérdida de explantes en los tratamientos control fue la oxidación, llegando a ser hasta del 81.25% (Tabla 9). En este grupo no se observó una relación directa entre el tiempo de exposición y la supervivencia de los explantes, ya que los porcentajes de supervivencia entre los tratamientos fueron heterogéneos.

En la mayoría de los tratamientos por pulsos de BA y TDZ la oxidación de los explantes fue mucho menor que en los tratamientos control (Tabla 9). Estos resultados indican que BA y TDZ tuvieron un efecto positivo en la supervivencia de los explantes.

La supervivencia de los explantes expuestos a pulsos de BA estuvo entre el 31.25% y 93.75%. De manera general, se observa que las mayores supervivencias de los explantes se registraron en los tratamientos con tiempos de exposición de 24 y 48 h. (Tabla 9). Los explantes expuestos a pulsos de 25 mg/L de BA durante 48 h. fueron los que presentaron la mayor supervivencia del grupo, seguido por el tratamiento adicionado con 100 mg/L con un tiempo de exposición de 24 h (Tabla 9). En el otro extremo, los explantes expuestos al mayor tiempo de exposición (96h.), presentaron los menores porcentajes de supervivencia, y en este grupo se registró la menor supervivencia entre todos los tratamientos, la cual fue de 31.15% (Tabla 9). El tiempo de exposición tuvo un efecto en la supervivencia de los explantes, en cambio, las diferentes concentraciones utilizadas del BA no tuvieron un efecto tan evidente en la

supervivencia de los explantes, pues la supervivencia registrada entre los tratamientos con diferentes concentraciones fue heterogénea.

La supervivencia de los explantes expuestos a pulsos de TDZ fue similar a la de los explantes expuestos a pulsos de BA, y estuvo entre el 43.75% y 87.5% (Tabla 9). Los explantes expuestos a pulsos de 24 h. fueron los que tuvieron los mayores porcentajes de supervivencia en este grupo, el mayor porcentaje de supervivencia se registró en el tratamiento adicionado con 5 mg/L. Los explantes sometidos a tiempos de exposición de 6 y 96 h. presentaron los menores porcentajes de supervivencia. La menor supervivencia entre todos los tratamientos se registró en el tratamiento adicionado con 10 mg/L con un tiempo de exposición de 6 h. Al igual que en los tratamientos adicionados con BA, las diferentes concentraciones del TDZ tampoco parecieron afectar la supervivencia de los explantes, pues los rangos de supervivencia entre los diferentes concentraciones fueron heterogéneos.

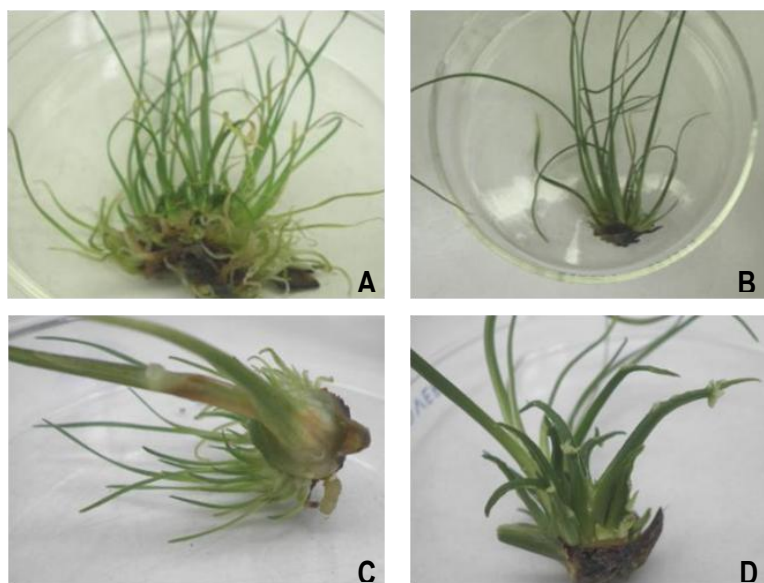


Figura 10. Formación de brotes a partir de explantes de *Beaucarnea purpusii* sembrados en tratamientos expuestos a pulsos A) Brotes normales e hiperhidratados a partir de un explante expuesto a 25 mg/L de BA durante 24 h. B) Brotes normales axilares formados a partir de un explante expuesto a 5 mg/L de TDZ durante 24 h. C) Formación de brotes adventicios sobre la base de un brote expuesto a 5 mg/L de TDZ durante 6 h. D) Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes formados a partir de un explante expuesto a 30 mg/L de TDZ durante 24 h.

Tabla 9. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempos de exposición

Tratamiento (mg/L)	Tiempo (h)	Explantos con respuesta / n	Supervivencia (%)	Pérdida de explantes oxd./hiperh./cont. (%)		
Control						
0	6	5/16	31.3	37.5	31.50	0.0
0	24	2/16	12.5	81.25	6.25	0.0
0	48	6/16	37.5	43.75	12.5	0.0
0	96	7/16	43.75	56.25	0.0	0.0
BA						
25	6	9/16	56.25	31.25	6.25	6.25
50	6	8/16	50	43.75	6.25	0.0
100	6	10/16	68.75	25	6.25	0.0
25	24	9/16	56.25	43.75	0.0	0.0
50	24	7/16	43.75	43.75	12.5	0.0
100	24	13/16	81.25	12.5	6.25	0.0
25	48	15/16	93.75	6.25	0.0	0.0
50	48	9/16	56.25	18.75	25	0.0
100	48	12/16	75	25	0.0	0.0
25	96	5/16	31.25	56.25	18.75	0.0
50	96	8/16	50	37.5	12.50	0.0
100	96	8/16	50	50	0.0	0.0
TDZ						
5	6	11/16	68.75	21.25	0.0	0.0
10	6	7/16	43.75	25	31.25	0.0
30	6	8/16	50	18.75	6.25	25
5	24	14/16	87.5	6.25	6.25	0.0
10	24	13/16	81.25	12.5	6.25	0.0
30	24	14/16	87.5	12.5	0.0	0.0
5	48	9/16	56.25	12.5	0.0	31.25
10	48	12/16	75	25	0.0	0.0
30	48	14/16	87.5	12.5	0.0	0.0
5	96	8/16	50	37.5	12.5	0.0
10	96	11/16	68.75	31.15	0.0	0.0
30	96	10/16	62.5	25	12.5	0.0

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$)

* Los brotes se perdieron por contaminación

Oxd.: oxidación. Hiperh: hiperhidratación. Cont: contaminación.

Respuestas morfogenéticas

Al igual que en los dos experimentos del medio semi-sólido, los explantes expuestos a tratamientos por pulsos presentaron las mismas tres respuestas morfogenéticas, que fueron la formación de brotes hiperhidratados, brotes normales y brotes adventicios formados a partir de las hojas (Figura 10).

La formación de brotes hiperhidratados ocurrió de manera muy similar que en los tratamientos en medio semi-sólido. Los brotes adquirieron una apariencia vítrea, color verde claro desde el primer mes de la fase de elongación, estos brotes no fueron viables y eventualmente se tornaron color café y murieron.

El proceso de formación de normales brotes fue muy similar que en los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido. La principal diferencia fue que en este experimento, al finalizar la fase de inducción los explantes aún no respondían, pues el tiempo de inducción fue de sólo algunas horas, y los explantes tenían un aspecto muy similar al inicio de los experimentos.

Los brotes normales inducidos en los tratamientos por pulsos de BA y TDZ tuvieron características morfológicas muy similares. Fueron de origen tanto axilar como adventicio, pues los brotes se formaron a partir de todo el explante ya fuera en la parte superior o en la parte basal de forma radial. La única diferencia entre los brotes inducidos por BA y por TDZ fue que, al igual que ocurrió en los tratamientos adicionados con TDZ en medio de cultivo semi-sólido, algunos de los explantes sometidos a pulsos de TDZ formaron brotes adventicios a partir de las hojas de brotes formados previamente (Figura 10).

Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes

Como se ha mencionado antes, los brotes normales son los que se prefieren porque son los que pueden desarrollarse en plántulas completas. La formación de brotes normales fue continua durante todo el experimento, pero la formación de los brotes fue mucho menor que en los tratamientos en medio semi-sólido (Gráfica 2, 6 y 10).

En los tratamientos adicionados con BA, la mayor formación de brotes normales, en los tres meses de la fase de inducción, se registró a partir de los explantes expuestos a los diferentes pulsos de BA durante 48 h. (Gráfica 10). En todas las concentraciones sometidas a 48 h., la formación de los brotes tiene un comportamiento lineal, incluso en el tratamiento control la formación de los brotes normales continuó hasta el tercer mes de la siembra. La concentración

que indujo la mayor formación de brotes normales a lo largo de los tres meses fue la de 100 mg/L de BA (Gráfica 10).

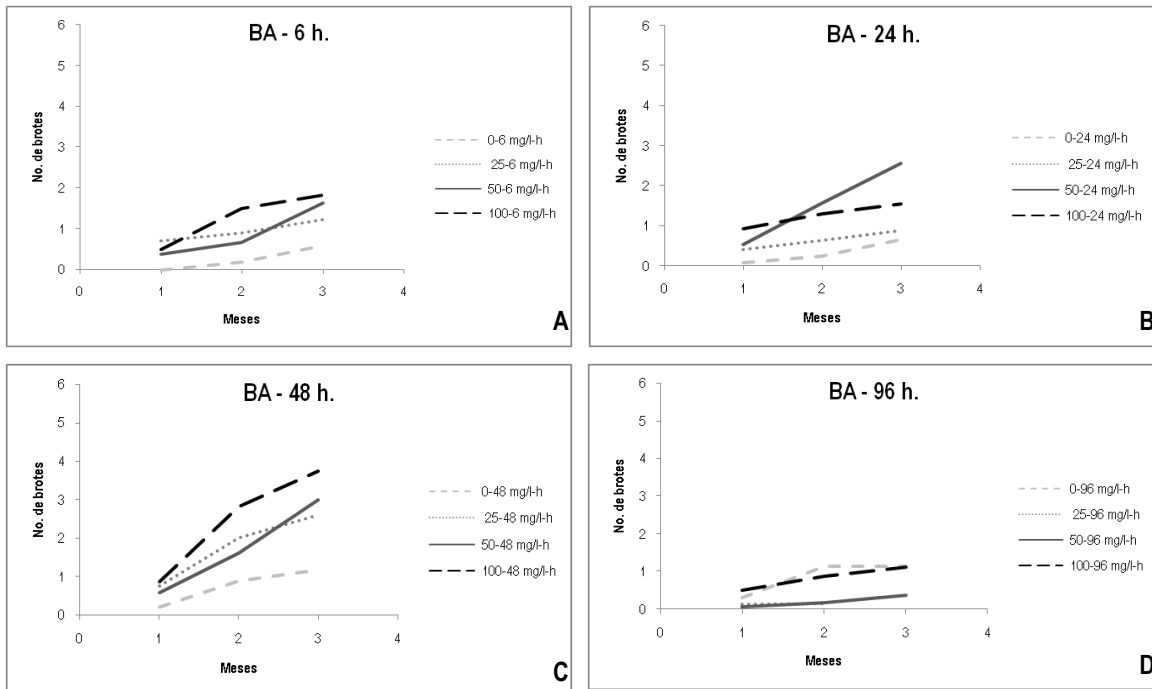
Dentro de los tratamientos expuestos a 24 h. de BA, los explantes sometidos a 50 mg/L formaron el mayor promedio de brotes entre el segundo y el tercer mes de la fase de elongación. En las demás concentraciones, el promedio de los brotes no incrementó tanto a lo largo del tiempo.

La formación de brotes normales a partir de explantes sometidos a diferentes concentraciones de BA con tiempos de exposición de 6 y 96 h. fue similar en los tres meses de la fase de elongación (Gráfica 10). La formación de los brotes no tuvo un incremento tan marcado a lo largo de los tres meses, porque los promedios alcanzados en cada concentración fueron bajos.

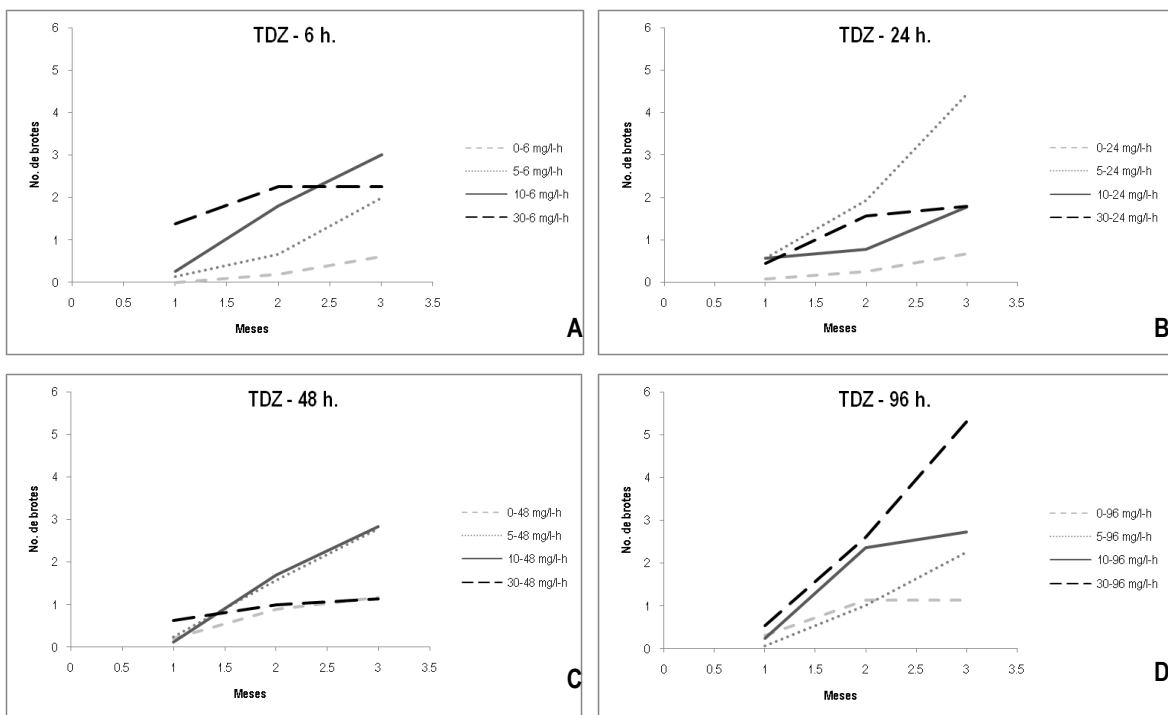
Los explantes sometidos a pulsos de TDZ, formaron más brotes a lo largo de la fase de elongación que los sometidos a pulsos de BA. Los explantes sometidos a pulsos de TDZ durante 96 h. formaron los mayores promedios de brotes a lo largo del tiempo, en especial la concentración de 30 mg/L fue la que indujo los promedios más altos en todos los meses y la formación de los brotes tuvo un comportamiento exponencial (Gráfica 11).

En el tiempo de exposición de 24 h., los explantes sometidos a pulsos de 5 mg/L de TDZ fueron los que formaron el mayor promedio de brotes, en especial entre el segundo y el tercer mes. En las demás concentraciones la formación de los brotes fue menor (Gráfica 11).

La formación de los brotes a partir de explantes sometidos a pulsos de TDZ durante 6 y 48 h. fue menor que en los demás tiempos de exposición. En el tiempo de exposición de 6 h. los explantes con mayor formación de brotes a lo largo del tiempo fueron los sometidos a la concentración de 10 mg/L; y en el tiempo de exposición de 48 h. los explantes con mayor formación de brotes fueron los sometidos a las concentraciones de 5 y 10 mg/L (Gráfica 11).



Gráfica 10. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de *Beaucarnea purpusii* sembradas en medio de cultivo MS líquido expuestas a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición. A) Tratamientos expuestos a pulsos de 6 h. B) Tratamientos expuestos a pulsos de 24 h. C) Tratamientos expuestos a pulsos de 48 h. D) Tratamientos expuestos a pulsos de 96 h.



Gráfica 11. Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de *Beaucarnea purpusii* sembradas en medio de cultivo MS líquido expuestas a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición. A) Tratamientos expuestos a pulsos de 6 h. B) Tratamientos expuestos a pulsos de 24 h. C) Tratamientos expuestos a pulsos de 48 h. D) Tratamientos expuestos a pulsos de 96 h.

Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento

Se analizaron los brotes totales formados por explantes totales, es decir con los que se inició el experimento (n=16). Al hacer uso de la prueba estadística ANOVA fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos en la formación de brotes totales ($p < 0.001$), hiperhidratados ($p < 0.001$) y normales ($p < 0.001$).

En general, el promedio de brotes totales registrado en cada tratamiento fue bajo en comparación con los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido. Dentro de los brotes totales registrados en los tratamientos por pulsos, la formación de brotes hiperhidratados fue mayor que en los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido adicionado con 0.8% de agar, pero fue menor que en el medio de cultivo semi-sólido adicionado con 0.6% de agar; y el promedio de los brotes normales registrados en los tratamientos por pulsos, en general fue menor que el registrado en los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido (Gráfica 3, 7, 12 y 13).

Los explantes sembrados en los tratamientos control formaron el menor promedio de brotes totales, seguido por los tratamientos por pulsos de BA y los tratamientos por pulsos TDZ indujeron los mayores promedios de brotes por explante (Gráfica 12 y 13). En general, el promedio de los brotes registrado en los tratamientos control fue bajo (Gráfica 12), lo cual estuvo influido por la alta pérdida de explantes por oxidación, y no se estableció diferencia significativa entre estos tratamientos. Los explantes sometidos a los tratamientos control con tiempos de exposición de 48 y 96 h. fueron los que formaron los mayores promedios de brotes totales en este grupo, con un total de 0.50 brotes cada uno; en el tratamiento expuesto a 96 h. no se registraron brotes hiperhidratados y en el de 48 h. el promedio de brotes hiperhidratados fue muy bajo (Tabla 10). El tratamiento control con un tiempo de exposición de 24 h. fue el que indujo el menor promedio de brotes totales del grupo, sin embargo, en este tratamiento únicamente sobrevivieron dos explantes (Tabla 10).

Los explantes expuestos a pulsos de BA, en general, formaron pocos brotes en todos los tratamientos en comparación con los brotes registrados en los tratamientos en medio de cultivo semi-sólido adicionados con BA. A pesar de que el promedio de los brotes fue bajo y no todos los tratamientos presentaron diferencia estadística, se puede observar que el BA tuvo un efecto en la formación de los brotes. La formación de los brotes estuvo determinada tanto por las concentraciones de BA tanto por los tiempos de exposición, y el promedio de los brotes totales fluctuó entre los 0.37 y 3.18 (Tabla 10).

Como se observa en la gráfica 12, cuando los explantes se sometieron a pulsos de BA durante 6 y 24 h. formaron un promedio de los brotes fue similar. Cuando se incrementó el tiempo de exposición a 48 h., los explantes comenzaron a formar mayor número de brotes totales, en este tiempo de exposición también se registraron los mayores promedios de brotes normales. Por último, cuando el tiempo de exposición fue de 96 h., el promedio de los brotes tanto hiperhidratados como normales disminuyó (Tabla 10).

Al analizar los tratamientos en grupos por cada tiempo de exposición, se observa que en casi todos los tratamientos, la concentración de 100 mg/L de BA fue la que indujo el mayor promedio de brotes totales, siendo en su mayoría normales. La única excepción fue en el tiempo de exposición de 96 h., en el cual el mayor promedio de brotes totales se registró en los tratamientos con pulsos de 50 mg/L de BA. Por lo tanto, los tratamientos adicionados con 100 mg/L con tiempos de exposición de 24 y 48 h. fueron los más convenientes para la formación de brotes totales (Tabla 10).

Los explantes sometidos a 100 mg/L de BA durante 48 h fueron los que formaron el mayor promedio de brotes totales dentro del grupo de BA, y en este tratamiento también se registró el mayor número de brotes normales (Tabla 10). El tratamiento adicionado con 100 mg/L con un tiempo exposición de 24 h., y el tratamiento adicionado con 25 mg/L con un tiempo de exposición de 48 h. indujeron un promedio de 2.81 brotes totales cada uno, pero en el tratamiento adicionado con 100 mg/L con un tiempo de exposición de 24 h. la formación de brotes hiperhidratados fue la mayor del grupo de BA e incluso fue mayor al promedio de brotes normales (Gráfica 12). Estos tres tratamientos fueron los únicos, dentro del grupo de BA, que presentaron diferencia estadística con los tratamientos control. En el otro extremo, los explantes expuestos a una concentración de 25 mg/L de BA durante 96 h. fueron los que formaron el menor promedio de brotes totales entre todos los tratamientos adicionados con BA y todos los brotes fueron hiperhidratados, además fue en el único tratamiento donde no se registraron brotes normales entre todos los tratamientos (Tabla 10).

En los tratamientos por pulsos de TDZ, se registraron los mayores promedios de brotes totales (Gráfica 12), pero en comparación con el medio semi-sólido adicionado con TDZ, el promedio de los brotes formados a partir de explantes fue bajo (Tabla 3 y 12). El promedio de los brotes varió dependiendo el tiempo de exposición y las concentraciones empleadas, pero estuvo entre 2.37 y 6.31 brotes totales.

De manera general, los explantes formaron más brotes totales cuando se sometieron a pulsos de TDZ durante 24 h., pero en los tratamientos con las mayores concentraciones de TDZ

la mayoría de los brotes fueron hiperhidratados (Gráfica 13). Cuando los explantes se sometieron a pulsos de TDZ durante 48 h., el promedio de los brotes totales disminuyó, a excepción del tratamiento adicionado con 30 mg/L de TDZ (Gráfica 13). En el tiempo de exposición de 96 h., el promedio de los brotes totales fue similar que en el tiempo de 48 h., pero la formación de brotes normales fue mayor en 96 h. Los explantes sometidos a pulsos de 6 h. formaron los menores promedios de brotes en todas las concentraciones y la relación entre brotes hiperhidratados y normales fue similar (Tabla 10).

Al tomar en cuenta por separado las diferentes concentraciones utilizadas, se observa en general que, entre mayor fue la concentración empleada en los diferentes tiempo de exposición, mayor fue el promedio de brotes registrados (Gráfica 13). La concentración de 30 mg/L fue la que indujo los mayores promedios de brotes en la mayoría de los tratamientos, a excepción del tratamiento adicionado con 5 mg/L con un tiempo de exposición de 24 h, el cual fue el que indujo el mayor número de brotes de entre todos los tratamientos. Estos datos nos sugieren que todas las concentraciones de TDZ indujeron la formación de brotes a partir de explantes de *B. purpusii*, pero la concentración de 30 mg/L fue la que indujo el mayor promedio de brotes totales (Tabla 10).

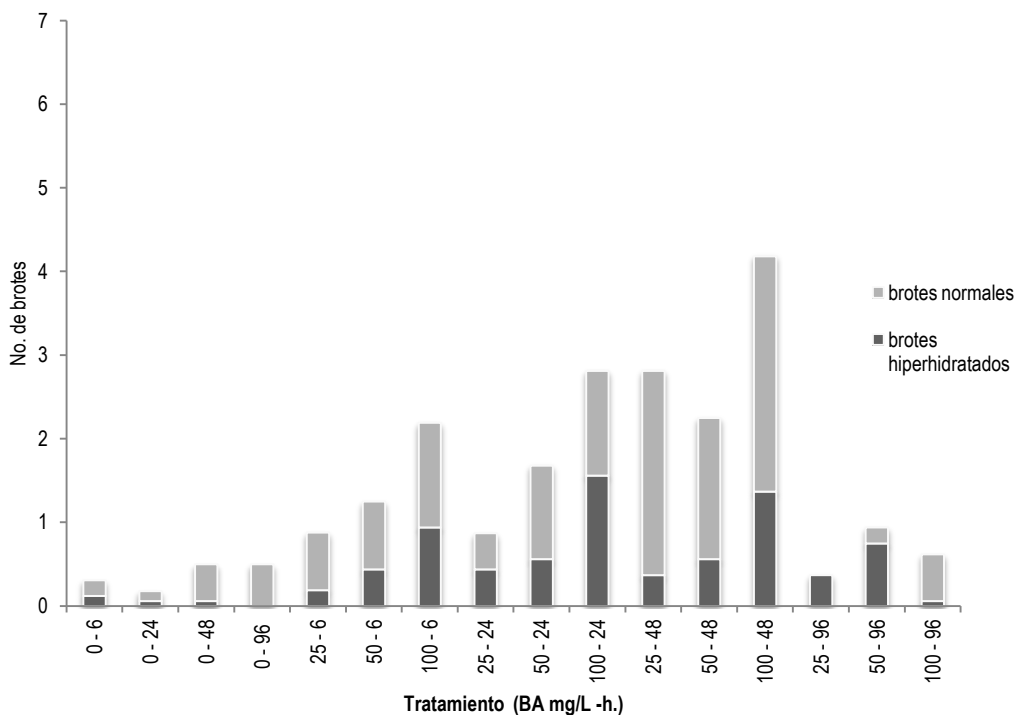
Dentro de todos los tratamientos, el que indujo la mayor formación de brotes totales fue el de los pulsos de 5 mg/L de TDZ durante 24 h y en este tratamiento también se registró el mayor promedio de brotes normales y fue estadísticamente diferente a la mayoría de los demás tratamientos. Posteriormente, los explantes expuestos a 30 mg/L de TDZ durante 48 h. formaron 5.37 brotes totales, y además formaron el mayor promedio de brotes hiperhidratados entre todos los tratamientos y además se estableció diferencia estadística entre los todos los tratamientos. En el otro extremo, el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA con un tiempo de exposición de 96 h. fue el que indujo el menor promedio de brotes totales (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempo de exposición sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii*

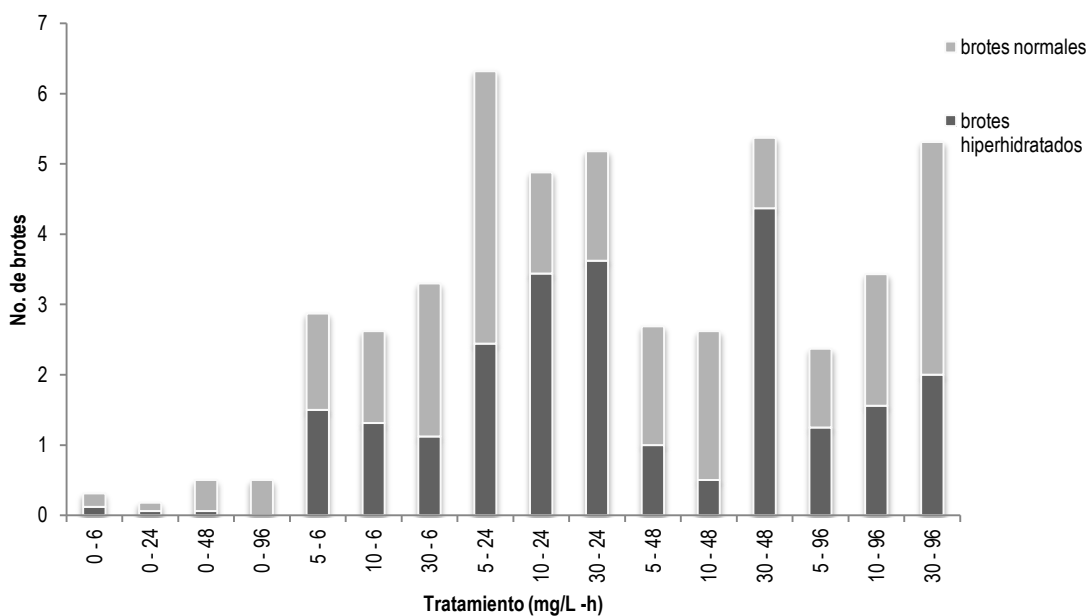
Tratamiento (mg/L)	Tiempo (h)	Promedio de brotes totales/ explantes totales \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes totales \pm DS
Control				
0	6	0.31 \pm 0.48i	0.12 \pm 0.34efg	0.19 \pm 0.40fg
0	24	0.19 \pm 0.40i	0.06 \pm 0.25efg	0.12 \pm 0.34fg
0	48	0.50 \pm 0.73ghi	0.06 \pm 0.25efg	0.44 \pm 0.72efg
0	96	0.50 \pm 0.63ghi	0.00 \pm 0.00g	0.50 \pm 0.63efg
BA				
25	6	0.87 \pm 0.62efghi	0.19 \pm 0.40efg	0.69 \pm 1.25defg
50	6	1.25 \pm 1.53defghi	0.44 \pm 0.96efg	0.81 \pm 1.47defg
100	6	2.19 \pm 2.10defghi	0.94 \pm 1.12defg	1.25 \pm 1.69cdefg
25	24	0.87 \pm 1.36efghi	0.44 \pm 0.89efg	0.43 \pm 0.63efg
50	24	1.68 \pm 3.2defghi	0.56 \pm 0.96efg	1.12 \pm 2.75cdefg
100	24	2.81 \pm 2.66cdef	1.56 \pm 2.10cde	1.25 \pm 1.88cdefg
25	48	2.81 \pm 1.83cdef	0.37 \pm 0.62efg	2.44 \pm 1.86abcd
50	48	2.25 \pm 3.47defghi	0.56 \pm 0.73efg	1.69 \pm 3.16bcdefg
100	48	3.18 \pm 3.21bcd	1.37 \pm 1.26efg	2.81 \pm 2.59abc
25	96	0.37 \pm 0.62hi	0.37 \pm 0.62efg	*0.0 \pm 0.0g
50	96	0.94 \pm 1.12efghi	0.75 \pm 1.12efg	0.19 \pm 0.40fg
100	96	0.62 \pm 1.20fghi	0.06 \pm 0.25efg	0.56 \pm 1.03efg
TDZ				
5	6	2.87 \pm 1.36cde	1.50 \pm 2.58cde	1.37 \pm 3.55cdefg
10	6	2.62 \pm 3.26defg	1.31 \pm 2.21cdef	1.31 \pm 2.44cdefg
30	6	3.31 \pm 6.22bcd	1.12 \pm 2.60defg	2.18 \pm 5.45abcde
5	24	6.31 \pm 5.62a	2.44 \pm 2.92bc	3.88 \pm 5.29a
10	24	4.87 \pm 3.68ab	3.44 \pm 3.18ab	1.44 \pm 2.83cdefg
30	24	5.19 \pm 3.81ab	3.62 \pm 3.00ab	1.56 \pm 3.59bcdefg
5	48	2.56 \pm 3.16defgh	1.00 \pm 1.55defg	1.69 \pm 3.16bcdefg
10	48	2.62 \pm 3.18defg	0.50 \pm 1.50efg	2.12 \pm 2.94abcde
30	48	5.37 \pm 3.20ab	4.37 \pm 2.63a	1.00 \pm 1.79cdefg
5	96	2.37 \pm 3.50defghi	1.25 \pm 1.39cdefg	1.12 \pm 2.80cdefg
10	96	3.44 \pm 5.03bcd	1.56 \pm 3.22cde	1.87 \pm 2.75bcdef
30	96	5.31 \pm 5.57ab	2.00 \pm 2.44cd	3.31 \pm 4.74ab

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$)

* Los brotes se perdieron por contaminación



Gráfica 12. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición



Gráfica 13. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición

Análisis de formación de brotes por explante con respuesta por tratamiento

En este experimento también se analizaron sólo los brotes formados a partir de explantes con respuesta debido a que hubo una pérdida importante de material por oxidación. Al analizar los datos de esta manera fue posible establecer diferencia significativa en la formación de brotes totales ($p < 0.001$) e hiperhidratados ($p < 0.001$), pero no fue posible establecer diferencia significativa en la formación de brotes normales ($p = 0.079$).

Los tratamientos control fueron los que indujeron la menor formación de brotes totales, posteriormente BA, y en la mayoría de los casos, los explantes expuestos a pulsos de TDZ fueron los que formaron los mayores promedios de brotes totales (Gráfica 14 y 15).

Cuando se analizan solamente los explantes con respuesta, el promedio de los brotes totales registrados en el control incrementó. Los explantes cultivados en los tratamientos control formaron entre 1.00 y 1.33 brotes por explante con respuesta. Cuando los explantes se expusieron a 48 h. formaron el mayor promedio de brotes totales, y la menor formación de brotes totales se registró en los explantes expuestos a 6 y 24 h, en ambos tratamientos, aproximadamente el 40% de los brotes totales fueron hiperhidratados (Tabla 11).

Dentro de los tratamientos adicionados con BA, los mayores promedios de los brotes totales se registraron en el tiempo de exposición de 48 h., y además fue donde se registraron los mayores promedios de brotes normales. En los tratamientos con tiempos de exposición de 6 h y 24 h. los promedios de los brotes totales fueron similares, y por último, el mayor tiempo de exposición fue muy alto, pues la formación de los brotes totales comenzó a disminuir y en algunos de los tratamientos la formación de brotes hiperhidratados fue mayor a la de brotes normales (Gráfica 14).

Al separar los tratamientos por grupos se observa que, en general, cuando se incrementó la concentración de BA la formación de los brotes totales también aumentó, la concentración de 100 mg/L fue la que indujo la mayor formación de brotes totales. La única excepción fue el tratamiento adicionado con 50 mg/L de BA expuesto a 96 h., el cual indujo mayor formación de brotes que el tratamiento adicionado con 100 mg/L en el mismo tiempo de exposición. La relación de brotes hiperhidratados y normales, no pareció ser afectada por la concentración del BA, pues en la mayoría de los casos, fue similar el promedio de los brotes hiperhidratados y normales.

Los explantes sometidos a 100 mg/L de BA durante 48 h. fueron los que formaron el mayor promedio de brotes totales del grupo de BA, y también formaron el mayor promedio de brotes

normales (Tabla 10). En el tratamiento adicionado con 100 mg/L de BA con un tiempo de exposición de 6 h., se registró un total de 3.18 brotes totales, y en este mismo se registró el mayor promedio de brotes hiperhidratados del grupo de BA (Tabla 11). En el otro extremo, la menor formación de brotes totales se registró en explantes expuestos a 100 mg/L de BA durante 96 h (Tabla 11).

Dentro de los pulsos con TDZ, de manera general, los explantes que formaron el mayor promedio de brotes fueron los expuestos a pulsos de 24 h., y también el promedio de los brotes hiperhidratados fue de los mayores. La formación de brotes totales en los tratamientos con tiempos de exposición de 6 y 96 h. fue similar entre ellos, pero en el tiempo de exposición de 96 h. la formación de brotes normales fue algo mayor que en los otros tiempos de exposición. Sin embargo, los promedios de los brotes entre los tratamientos fue heterogéneo y no hay una relación directa entre el tiempo de exposición y la formación de los brotes (Tabla 11).

La concentración de 30 mg/L de TDZ fue la que indujo los mayores promedios de brotes totales, a excepción del tiempo de exposición de 24 h., en el cual la concentración de 5 mg/L indujo mayor formación de brotes que 30 mg/L. Al analizar sólo las concentraciones por separado, tampoco se encontró un efecto directo entre la concentración utilizada y la formación de brotes totales, pues los promedios fueron heterogéneos y no se presentó un patrón definido (Gráfica 15).

Los explantes que formaron el mayor promedio de brotes totales fueron los expuestos a pulsos de 30 mg/L de TDZ durante 96 h., y además también formaron el mayor promedio de brotes normales entre todos los tratamientos (Tabla 11). En el tratamiento adicionado con 30 mg/L de TDZ con un tiempo de exposición de 48 h. se registró uno de los mayores promedios de brotes totales y se registró el mayor promedio de brotes hiperhidratados, y además el menor promedio de brotes normales. Por el otro lado, los explantes que presentaron la menor formación de brotes totales fueron los que se sometieron a 10 mg/L de TDZ durante 48 h. (Tabla 11).

Dentro de todos los tratamientos por pulsos, el TDZ fue más conveniente que el BA, ya que indujo mayor formación de brotes normales en la mayoría de los tratamientos. El tratamiento que indujo la mayor formación de brotes normales fue el adicionado con 30 mg/L de TDZ con un tiempo de exposición de 96 h. Pero, el tratamiento adicionado con 5 mg/L con un tiempo de exposición de 24 h. indujo un promedio de brotes similar y no se estableció diferencia significativa, además que el promedio de los brotes hiperhidratados fue un poco menor (Tabla 11), por lo tanto, para este experimento se consideró al mejor tratamiento el adicionado con 5 mg/L con un tiempo de exposición de 24 h.

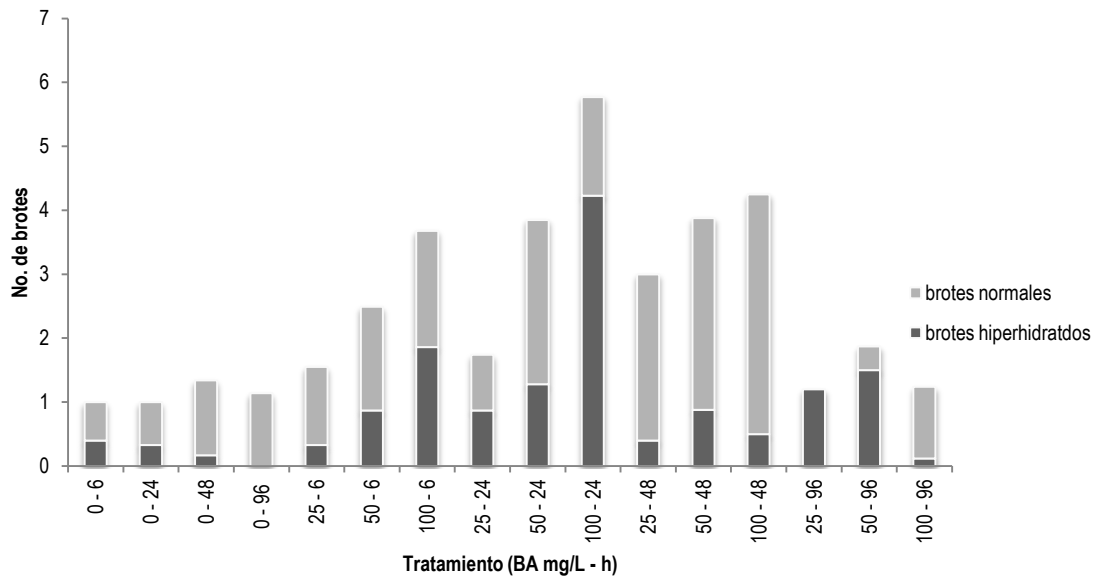
Tabla 11. Efecto de pulsos de diferentes concentraciones de citocininas durante diferentes tiempo de exposición sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta

Tratamiento (mg/L)	Tiempo (h)	Promedio de brotes totales / explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes con respuesta \pm DS
Control				
0	6	1.00 \pm 0.00e	0.40 \pm 0.55bcd	0.60 \pm 0.55
0	24	1.00 \pm 0.00e	0.33 \pm 0.58abcd	0.67 \pm 0.57
0	48	1.33 \pm 0.52e	0.17 \pm 0.41d	1.17 \pm 0.75
0	96	1.14 \pm 0.38e	0.00 \pm 0.00d	1.14 \pm 0.38
BA				
25	6	1.55 \pm 1.33e	0.33 \pm 0.58d	1.22 \pm 1.48
50	6	2.50 \pm 1.19e	0.87 \pm 1.25bcd	1.62 \pm 1.77
100	6	3.18 \pm 1.77e	1.86 \pm 2.11bcd	1.82 \pm 1.78
25	24	1.75 \pm 1.49e	0.87 \pm 1.12bcd	0.87 \pm 0.64
50	24	3.86 \pm 3.98cde	1.28 \pm 1.11bcd	2.57 \pm 3.82
100	24	2.81 \pm 2.54de	1.56 \pm 3.00bcd	1.25 \pm 1.98
25	48	3.00 \pm 1.73e	0.40 \pm 1.05d	2.60 \pm 1.80
50	48	3.89 \pm 3.95abc	0.89 \pm 0.78cd	3.00 \pm 3.77
100	48	4.25 \pm 3.07cde	0.50 \pm 1.45d	3.75 \pm 2.34
25	96	1.20 \pm 0.45e	1.20 \pm 0.45abcd	*0.0 \pm 0.0
50	96	1.87 \pm 0.83e	1.50 \pm 1.19bcd	0.37 \pm 0.52
100	96	1.25 \pm 1.49e	0.12 \pm 0.35d	1.12 \pm 1.25
TDZ				
5	6	4.10 \pm 1.23abc	2.10 \pm 2.89abcd	2.00 \pm 4.19
10	6	4.86 \pm 3.02bcde	1.86 \pm 2.11abcd	3.00 \pm 3.00
30	6	6.62 \pm 7.61abc	2.25 \pm 3.41abcd	4.37 \pm 7.27
5	24	7.21 \pm 5.42ab	2.78 \pm 2.96abcd	4.43 \pm 5.44
10	24	6.00 \pm 3.11abcd	4.23 \pm 3.00ab	1.77 \pm 3.06
30	24	5.93 \pm 3.47abc	4.14 \pm 2.85abc	1.78 \pm 3.81
5	48	4.55 \pm 2.92bcde	1.77 \pm 1.71abcd	2.78 \pm 2.90
10	48	3.50 \pm 3.23de	0.66 \pm 0.75d	2.83 \pm 3.10
30	48	6.14 \pm 2.60abc	5.00 \pm 2.15a	1.14 \pm 1.87
5	96	4.75 \pm 3.65bcde	2.50 \pm 0.75abcd	2.25 \pm 3.73
10	96	5.00 \pm 5.42bcde	2.27 \pm 3.72abcd	2.72 \pm 2.97
30	96	8.50 \pm 4.69a	3.20 \pm 3.39abcd	5.30 \pm 5.08

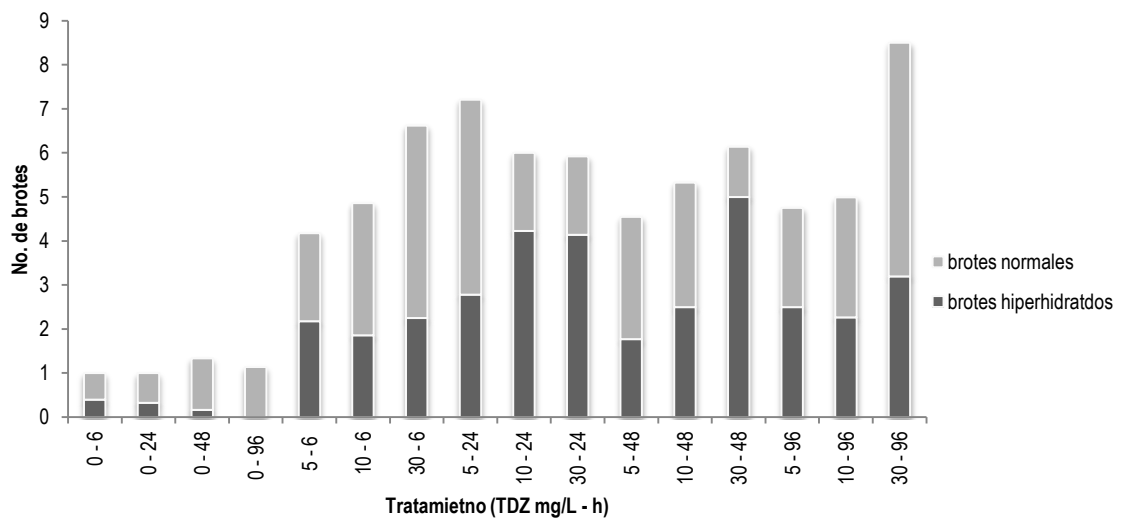
Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$)

* Los brotes se perdieron por contaminación

DS: Desviación estándar



Gráfica 14. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de BA durante diferentes tiempos de exposición.



Gráfica 15. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea purpusii* con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de TDZ durante diferentes tiempos de exposición.

Formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *Beaucarnea purpusii*

Los tratamientos por pulsos de TDZ también indujeron la formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *B. purpusii*, pero el promedio de los brotes registrados fue mucho menor que en los tratamientos en medio semi-sólido. Los pulsos de 30 mg/L de TDZ fueron los únicos que indujeron la formación de los brotes adventicios formados a partir de hojas, posiblemente las demás concentraciones fueron bajas para la formación de los brotes. Los brotes adventicios solamente se registraron en el tratamiento de pulsos de 30 mg/L de TDZ con un tiempo de exposición de 6 h., en el cual se obtuvieron 17 brotes en total, y en el tratamiento de pulsos de 30 mg/L de TDZ con un tiempo de exposición de 96 h., en el cual se registró un total de 6 brotes adventicios.

Fase de inducción de *Beaucarnea compacta* en medio de cultivo semi-sólido

Supervivencia de los explantes

La supervivencia de los explantes de *Beaucarnea compacta* fue diferente dependiendo el tratamiento utilizado (Tabla 12). En el tratamiento control, la supervivencia de los explantes fue del 35.71%. En este tratamiento la mayor parte de los explantes se perdieron por oxidación, la cual, como ya se ha mencionado antes, pudo haber sido causada por el daño al tejido provocado al realizar los cortes longitudinales.

Los explantes sembrados en el medio de cultivo adicionado con BA, presentaron mayores porcentajes de supervivencia que el tratamiento control y entre mayor fue la concentración de BA, la supervivencia de los explantes fue mayor y las pérdidas por oxidación fueron menores (Tabla 12).

Tabla 12. Supervivencia de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea purpusii* sometidos a diferentes tratamientos con citocininas y una concentración de agar del 0.8%

Tratamiento (mg/L)	Explantes con respuesta / n	Supervivencia (%)	Pérdida de explantes oxd./hiper./cont. (%)		
Control	5/14	35.71	57.14	0	7.14
BA					
3	8/14	57.14	35.71	0	7.14
5	10/14	71.43	14.28	7.14	7.14

Oxd.: oxidación. Hiperh: hiperhidratación. Cont: contaminación.

Respuestas morfogénicas

Las respuestas morfogénicas de los explantes de *B. compacta* fueron la formación de brotes hiperhidratados y normales por medio de organogénesis directa. Estas respuestas coincidieron con las obtenidas en los explantes de *B. purpusii*.

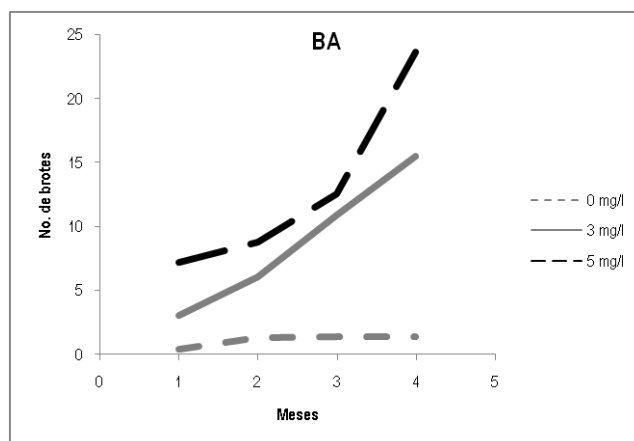
El proceso de formación de brotes ocurrió de forma muy similar que la formación de los brotes de *B. purpusii*. Al término de la fase de inducción los explantes comenzaron a responder, comenzaban por hincharse, en algunos casos ya se podían distinguir los primeros brotes, otros explantes tenían presencia de protuberancias, de las cuales posteriormente se formarían los brotes y la otra porción de los explantes comenzaban a hiperhidratarse.

El proceso de formación de brotes hiperhidratados ocurrió de forma muy similar que en la otra especie. Los explantes adquirieron una apariencia vítrea color verde claro desde la fase de inducción, y comenzaron a formar brotes hiperhidratados en su mayoría, estos brotes no fueron viables y eventualmente murieron. El promedio de los brotes hiperhidratados formados por *B. compacta* fue mucho menor que los formados por *B. purpusii* (Gráfica 3 y 17)

El proceso de formación de brotes normales ocurrió de forma similar que en la otra especie (Figura 11). Los brotes inducidos por BA tuvieron origen axilar y adventicio, pues se formaron a partir de todo el explante.

Formación de brotes normales por explante con respuesta por mes

La formación de los brotes normales comenzó desde el primer mes de la siembra en la fase de inducción (Gráfica 16). En el tratamiento control, la máxima formación de los brotes se registró en el segundo mes de la siembra, y posteriormente ya no hubo formación de brotes. En cambio, en los tratamientos adicionados con 3 y 5 mg/L de BA la formación de los brotes tuvo un comportamiento lineal, es decir continuó en todos los meses. El promedio de los brotes inducidos por la concentración de 5 mg/L fue mayor en todos los meses que el promedio de los brotes inducidos por la concentración de 3 mg/L (Gráfica 16).



Gráfica 16 .Formación de brotes normales por mes a partir de secciones longitudinales de *Beaucarnea compacta* sembradas en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de BA y 0.6% de agar.

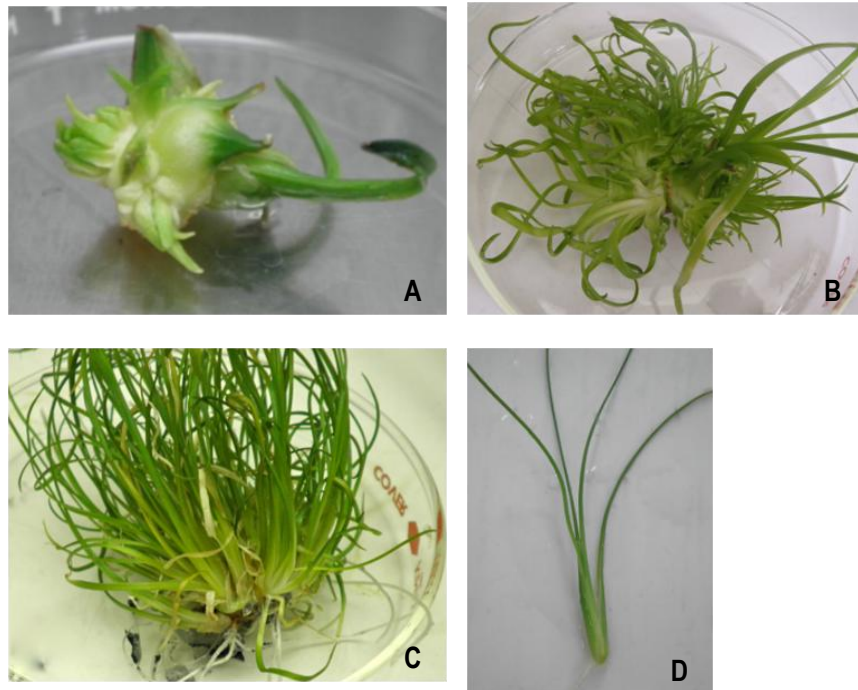


Figura 11. Formación de brotes de *Beaucarnea compacta* a partir de explantes sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con diferentes concentraciones de BA A) Explante con respuesta en la fase de inducción proveniente de un tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA. B) Brotes formados en el primer subcultivo provenientes de un tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA. C) Brotes formados en el segundo subcultivo provenientes de un medio con 3 mg/L. D) Plántula individualizada inducida en el tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA.

Análisis de formación de brotes por explantes totales por tratamiento

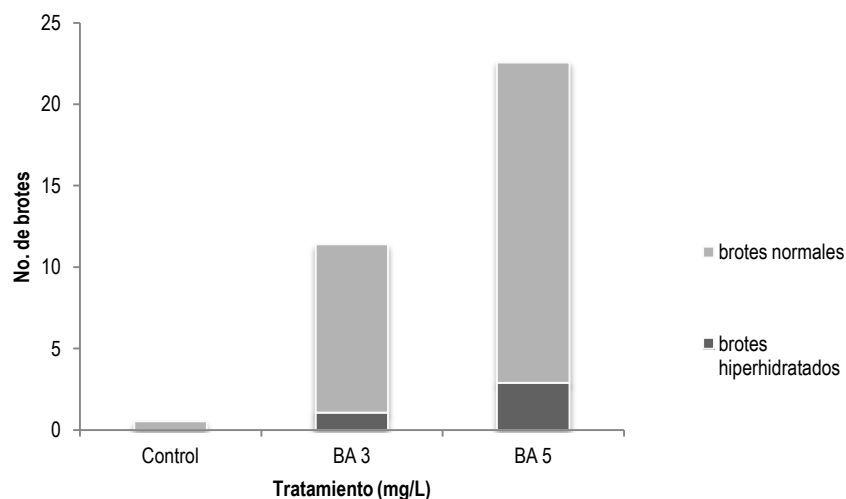
Se analizó la formación de los brotes totales, es decir la suma de los brotes hiperhidratados y normales a partir de explantes totales (n= 14). Al realizar el análisis estadístico, fue posible establecer diferencia significativa entre los tratamientos en la formación de brotes totales ($p < 0.001$) y normales ($p < 0.001$), pero no fue posible establecer diferencia significativa en la formación de brotes hiperhidratados ($p = 0.075$).

En el tratamiento control la formación de los brotes totales fue baja y todos los brotes fueron normales (Tabla 13). Entre mayor fue la concentración de BA adicionada al medio de cultivo, la formación de brotes hiperhidratados y normales fue mayor (Gráfica 17), pero en los tres casos el promedio de brotes hiperhidratados fue bajo en comparación con los brotes normales (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de diferentes concentraciones de BA y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea compacta*

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes totales \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes totales \pm DS
Control	0.54 \pm 0.88c	0.00	0.54 \pm 0.88c
BA			
3	11.42 \pm 9.98b	1.08 \pm 2.54	10.33 \pm 9.76b
5	22.58 \pm 12.89a	2.91 \pm 4.83	19.67 \pm 14.00a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$)
 DS: Desviación estándar.



Gráfica 17. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea compacta* sometidos a diferentes concentraciones de BA

Análisis de formación de brotes por explantes con respuesta por tratamiento

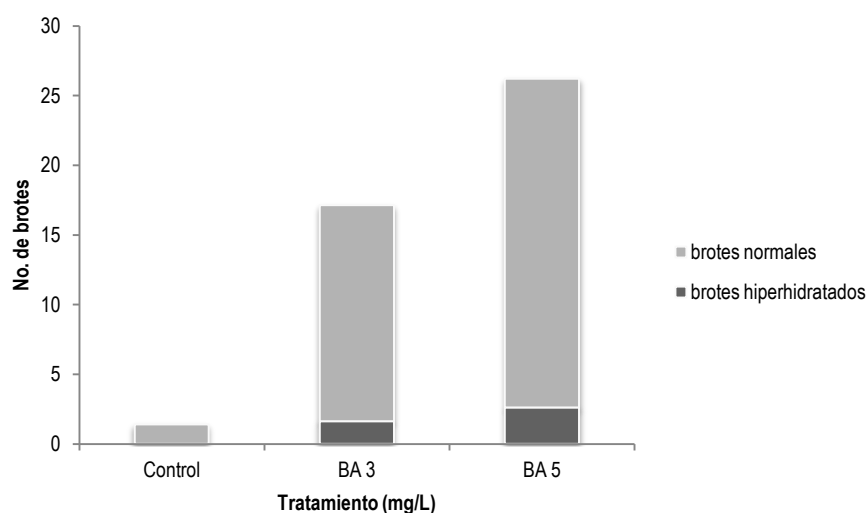
Se analizaron los datos tomando en cuenta únicamente los explantes que respondieron, debido a que, al igual que ocurrió con la otra especie, hubo pérdida del material causada por la oxidación de los explantes. Al analizar los datos, fue posible establecer diferencia estadística entre los tratamientos en la formación de brotes totales ($p < 0.001$) y normales ($p < 0.001$), y esta vez tampoco fue posible establecer diferencia significativa en la formación de brotes hiperhidratados ($p = 0.453$).

Al analizar los únicamente los explantes con respuesta, el promedio de los brotes es ligeramente mayor, en especial en el tratamiento control, en el cual se registró un total de 1.4 brotes (Gráfica 18). Cuando se analizaron solo los explantes con respuesta también es muy evidente que entre mayor fue la concentración de BA, la formación de brotes hiperhidratados y normales incrementó (Tabla 14). El tratamiento adicionado con 5 mg/L de BA se consideró el más conveniente para la propagación de la especie debido a que promovió la supervivencia de los explantes, y además, fue el tratamiento que indujo el mayor número de brotes normales y la formación de brotes hiperhidratados fue baja.

Tabla 14. Efecto de diferentes concentraciones de BA y de medio MS semi-sólido adicionado con 0.6 % agar sobre la formación de brotes a partir de secciones longitudinales de tallos de plántulas de *Beaucarnea compacta* con respuesta

Tratamiento (mg/L)	Promedio de brotes totales / explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes hiperhidratados / explantes con respuesta \pm DS	Promedio de brotes normales / explantes con respuesta \pm DS
Control	1.40 \pm 0.89	0.00	1.4 \pm 0.89b
BA			
3	17.12 \pm 6.68	1.62 \pm 3.02	15.50 \pm 7.63a
5	26.20 \pm 10.55	2.60 \pm 4.83	23.60 \pm 11.69a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.005$)
 DS. Desviación estándar.



Gráfica 18. Formación de brotes hiperhidratados y normales a partir de secciones longitudinales de plántulas de *Beaucarnea compacta* con respuesta sometidos a diferentes concentraciones de BA

Un dato interesante observado, fue que sólo brote, el cual provenía de un tratamiento adicionado con 5 mg/L, presentó formación de 9 brotes adventicios a partir de las hojas de brotes formados previamente. Este fue un dato interesante, pues *B. purpusii* sólo formó este tipo de brotes cuando los explantes se sembraron en los tratamientos adicionados con TDZ, en cambio *B. compacta* formó estos brotes en medio de cultivo adicionado con BA, pero solamente se registró a partir de un brote.

Fase de enraizamiento

Una vez que termina la fase de elongación y es posible individualizar los brotes, prosigue la fase de enraizamiento. Se seleccionaron sesenta brotes de *B. purpusii* que tuvieran una altura mayor a 5 cm y 1 cm de ancho de cada uno de los siguientes tratamientos: medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con BA, TDZ y tratamientos por pulsos de BA. No se hizo fase de enraizamiento para las plántulas provenientes de los tratamientos con KIN en medio de cultivo semi-sólido debido a que no se consideró un regulador efectivo para la micropropagación de la especie; tampoco se hicieron pruebas de enraizamiento de tratamientos provenientes de pulsos de TDZ porque hubo un problema de contaminación y no hubo material suficiente para terminar con esta fase. Se seleccionaron sesenta brotes de *Beaucarnea compacta* provenientes de tratamientos adicionados con BA. En todos los tratamientos utilizados se registró formación de raíces (Figura 12).

Fase de enraizamiento de *B. purpusii*

Como se observa en la tabla 15, los ejemplares de *B. purpusii* provenientes de los tres tratamientos formaron raíces en todos los tratamientos. El crecimiento de las raíces comenzó desde los primeros días, pero el tiempo de enraizamiento varió en cada ejemplar.

Los brotes provenientes del medio de cultivo adicionado con BA alcanzaron el mayor porcentaje de enraizamiento cuando se sembraron en el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado y en el medio de cultivo MS adicionado con 0.5 g/L de carbón activado, en ambos casos se alcanzó un enraizamiento del 90% a los 45 días de la siembra. Como se observa en la gráfica 19, en el medio de cultivo MS adicionado con 0.5 g/L de carbón activado a los 30 días ya se había alcanzado el 80% de enraizamiento, por lo tanto se consideró el tratamiento más efectivo para la formación de las raíces de los brotes provenientes de los tratamientos adicionados con BA.

Para las brotes provenientes del medio de cultivo adicionado con TDZ, los mejores tratamientos fueron el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado y el MS50 adicionado con 1 g/L de carbón activado, en ambos casos se alcanzó un enraizamiento del 90% (Tabla 15). En ambos tratamientos a los 30 días de la siembra se había alcanzado un 60% de enraizamiento por lo tanto en este caso, se consideraron a ambos tratamientos igual de efectivos (Gráfica 19).

Los brotes provenientes de los tratamientos por pulsos de BA, alcanzaron el mayor enraizamiento cuando se sembraron en medio de cultivo MS adicionado con 0.5 g/L de carbón activado, con un total del 90% de brotes enraizados (Tabla 15). A los 30 días de la siembra, ya se había alcanzado el 80% de enraizamiento de los brotes (Gráfica 19). En este caso, este tratamiento se consideró el más efectivo de todos.

En los tres lotes estudiados, el mayor enraizamiento de los brotes fue en medio de cultivo MS, además, en todos los casos los tratamientos que propiciaron el mayor enraizamiento de los brotes fueron los adicionados carbón activado, ya fuera con 0.5 o 1 g/L, pero se prefiere utilizar menor concentración con el fin de economizar el proceso. Por tanto, el mejor tratamiento para la formación de raíces de *B. purpusii* fue el medio de cultivo MS con 0.5 g/L de carbón activado.

Fase de enraizamiento de *B. compacta*

Los brotes de *B. compacta* también tuvieron altos porcentajes de formación de raíces en todos los tratamientos. La mayoría de los tratamientos indujeron el 90% de enraizamiento excepto el medio de cultivo MS50 adicionado con 1 g/L de carbón activado, en el cual el enraizamiento fue del 100% (Tabla 15). Como se muestra en la gráfica 19, a los 30 días, los brotes sembrados en el medio de cultivo MS50 adicionado con 0.5 g/L carbón activado y el mismo medio de cultivo pero sin carbón activado, ya habían presentado el 80% de formación de raíces, es decir, en estos medios de cultivo el enraizamiento fue más rápido que los demás medios. A pesar de que el medio de cultivo MS50 adicionado con 1 g/L de carbón activado fue el que indujo el mayor enraizamiento, se prefiere el medio de cultivo MS50 sin carbón activado, ya que la formación de las raíces fue más rápida, pues a los 30 días se logró el 80% de las raíces y al no utilizar carbón activado se puede economizar el proceso de micropropagación de la especie.

Tabla 15. Porcentaje de enraizamiento de plántulas de *Beaucarnea purpusii* a los 45 días provenientes de diferentes tratamientos

Tratamiento	<i>B. purpusii</i>			<i>B. compacta</i>
	BA	TDZ	BA pulsos	BA
MS/0	80	80	60	90
MS/0.5	90	70	90	90
MS/1	90	90	80	90
MS50/0	80	70	70	90
MS50/0.5	60	80	80	90
MS50/1	80	90	70	100

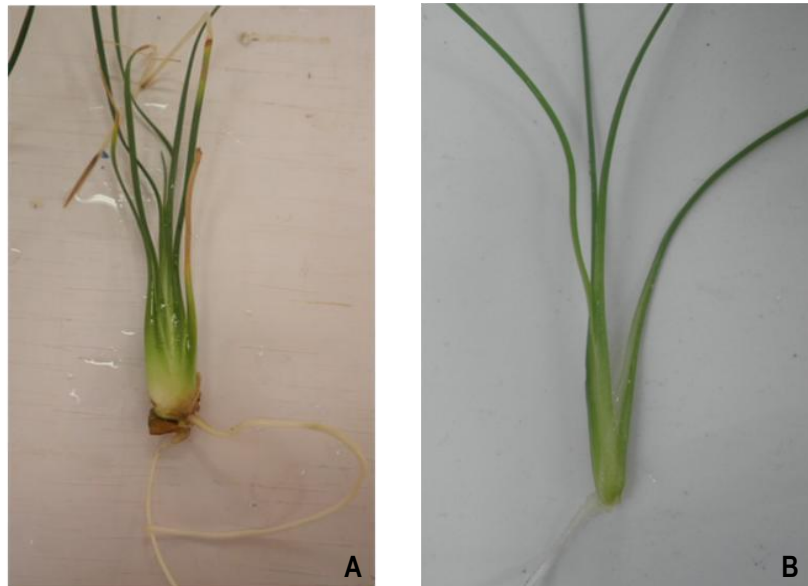
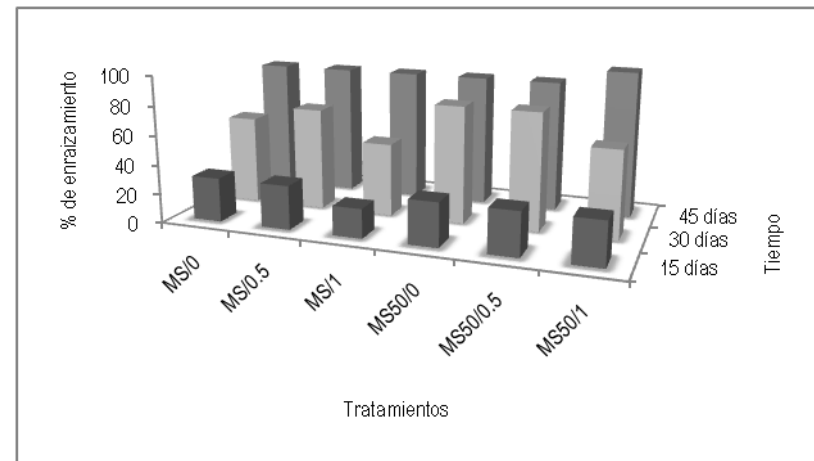
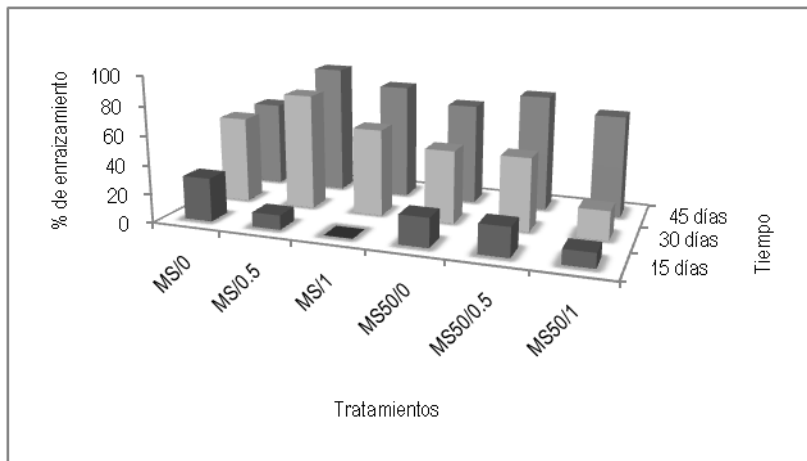
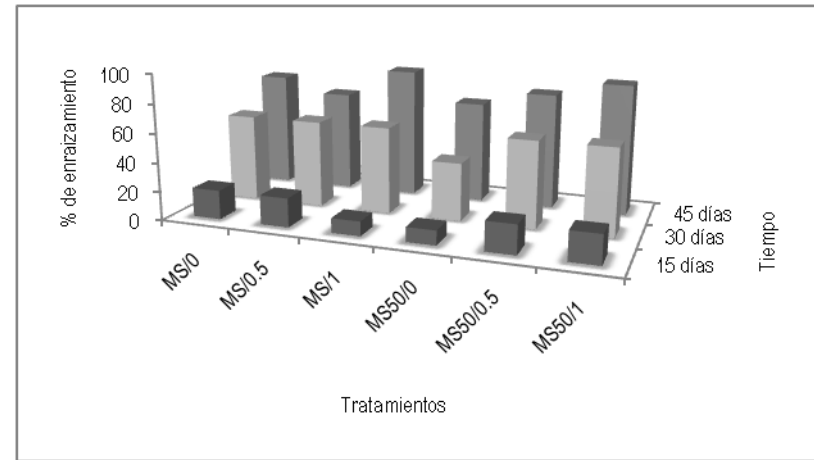
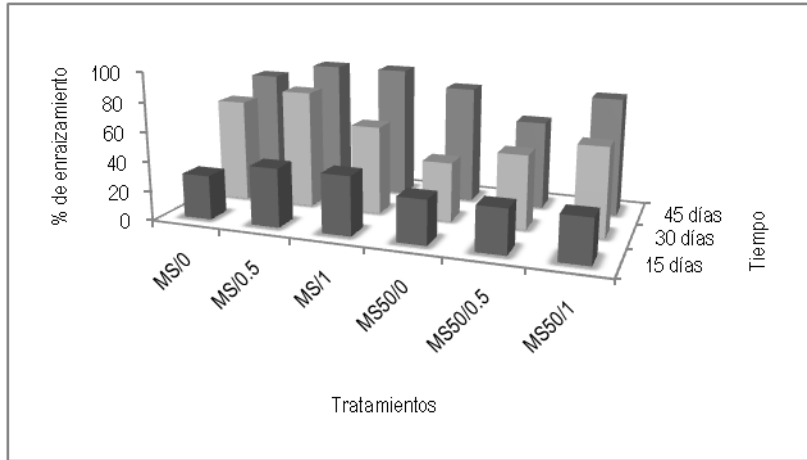


Figura 12. Brotes con raíz de A) *Beaucarnea purpusii* B) *B. compacta*.



Gráfica 19. Porcentaje de brotes con formación de raíces a los 15, 30 y 45 días, sembrados en diferentes tratamientos. A) Brotes de *B. purpusii* provenientes de tratamientos adicionados con BA. B) Brotes de *B. purpusii* provenientes de tratamientos adicionados con TDZ. C) Brotes de *B. purpusii* provenientes de tratamientos sometidos a pulsos de BA D) Brotes provenientes de *B. compacta* tratamientos adicionados con BA.

Fase de aclimatación

Fase de aclimatación de *B. purpusii*

Una vez finalizada la fase de enraizamiento se eligieron plántulas con raíz para sembrarlas en suelo en condiciones de invernadero. Se sembraron entre 40 y 45 plántulas en diferentes charolas dependiendo el tratamiento con el regulador de procedencia. No se tomó en cuenta la concentración de la que venían, pues se sabe que el efecto de los reguladores se pierde en los subcultivos y no influye en fases posteriores.

Al sembrar las plántulas se veían vigorosas y en buen estado. Al finalizar los dos meses del registro de la supervivencia, las plántulas tenían un tamaño muy similar al del inicio y seguían con una apariencia vigorosa (Figura 13). La supervivencia de las plántulas durante los dos meses en todos los casos fue del 100%. Las condiciones de invernadero utilizadas fueron muy efectivas ya que en ningún caso hubo pérdida de ninguna plántula.

Adicionalmente, se sembró un lote de 50 plántulas provenientes de medio de cultivo que se había contaminado en alguna fase de la metodología. A los dos meses de la siembra, se registró una supervivencia del 74%. Las plántulas que murieron se pudrieron probablemente porque los microorganismos las penetraron y provocaron su pérdida.

Fase de aclimatación de *B. compacta*

Una vez finalizada la fase de enraizamiento se eligieron solamente 15 plántulas de *B. compacta* para sembrarlas en suelo en condiciones de invernadero, debido a un problema de contaminación de algunos ejemplares y porque otros de ellos no presentaban raíz cuando se comenzó con la fase de aclimatación, por lo que se dejaron en los frascos. El registro de la supervivencia de las plántulas fue sólo de un mes debido a falta de tiempo para continuar tomando datos.

Al sembrar las plántulas se veían vigorosas y con un sistema radicular grande. Al mes de la siembra se registró una supervivencia del 100%, pues no hubo pérdida de ninguna de las plántulas. Al terminar el mes, las plántulas tenían un tamaño muy similar al del inicio de la siembra y seguían con una apariencia vigorosa (Figura 13).

También se hizo un pequeño lote de 30 plantas provenientes de frascos contaminados y solamente se registró una supervivencia del 13.3%. En este caso la mayoría de las plantas

murieron debido a la contaminación, además estas plántulas tenían menor tamaño que las otras, lo que también pudo haber sido causa de su pérdida.



Figura 13. Plántulas aclimatadas. A) *Beaucarnea purpusii*. B) *B. compacta*.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue establecer un método efectivo para la micropropagación de *Beaucarnea purpusii* y *B. compacta* que incluyera desde la germinación *in vitro* hasta la aclimatación de los individuos. La germinación *in vitro* de las semillas de ambas especies fue alta, llegando a ser casi del 100%. Esto concuerda con otras especies del género como *B. gracilis* y *B. recurvata* (Osorio y Mata, 2005), las cuales también tuvieron un porcentaje de germinación *in vitro* alto, mayor al 90%. Otros trabajos han evaluado la germinación de *B. inermis* (Castillo, 2011) y *B. plibilis* (Hernández *et al.*, 2009) en condiciones de invernadero, las semillas también tuvieron altos porcentajes de germinación, en general mayores al 90%.

Para continuar con la siguiente etapa de la micropropagación se utilizaron, como fuente de explante, secciones longitudinales de tallos de plántulas germinadas *in vitro* de *B. purpusii* y *B. compacta*. La técnica de dividir o dañar al meristemo apical se utiliza junto con la adición de reguladores del crecimiento para disminuir o eliminar la dominancia apical (George *et al.*, 2008), lo que promueve la activación de las yemas laterales (Cline, 1991). Esta técnica fue utilizada por Osorio y Mata (2005), en su trabajo indujeron mayor formación de brotes cuando realizaron cortes longitudinales que cuando utilizaron plántulas completas de *B. gracilis* y *B. recurvata*. Los cortes realizados a los explantes también se utilizan para facilitar la entrada de los reguladores del crecimiento a los tejidos (Norizaku *et al.*, 1985).

Otros tipos de explantes también han sido utilizados con éxito para inducir la formación de brotes en especies de *Beaucarnea*, Bettaieb *et al.* (2008) utilizaron yemas apicales de plantas adultas de *B. recurvata*, Sajeva *et al.* (1994) emplearon tallos de plántulas de *B. recurvata* mayores a 20 cm de largo, divididos en cinco secciones, Samyn (1993) utilizó como fuente de explante cortes de 1 a 2 mm de ápices de plántulas de *B. recurvata* germinadas en suelo.

La supervivencia de los explantes de *B. purpusii* y de *B. compacta* fue disminuida principalmente por la oxidación. El oscurecimiento del tejido se da por el efecto de los polifenoles, los cuales se producen en las plantas como respuesta ante un daño (Lewy y Rubinstein, 2010). Posiblemente, el corte hecho a las plántulas dañó a los tejidos lo que propició la liberación de los compuestos fenólicos y causó su oxidación y posterior necrosis. Osorio y Mata (2005) también reportaron cierta pérdida de explantes de *B. gracilis* y *B. recurvata* por oxidación, estos autores señalan que la causa de la necrosis fue el daño provocado en los tejidos al hacer los cortes longitudinales.

La oxidación de los explantes de *B. compacta* y de *B. purpusii* fue influida tanto por las citocininas como por el medio de cultivo utilizado. Algunas de las citocininas empleadas, disminuyeron la oxidación y por lo tanto promovieron la supervivencia de los explantes. El TDZ disminuyó la oxidación de los explantes de *B. purpusii* sembrados en medio de cultivo semi-sólido y líquido, y el BA disminuyó la oxidación de los explantes de *B. purpusii* sembrados en medio de cultivo líquido y de los explantes de *B. compacta* sembrados en medio de cultivo semi-sólido. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Sajeve *et al.* (1994) quienes sembraron secciones de tallo de *B. recurvata* en medio de cultivo MS adicionado con diferentes concentraciones de BA y encontraron que los explantes sembrados en tratamientos de BA presentaron menor oxidación que los sembrados en el tratamiento control. En otros trabajos también se ha mencionado que las citocininas pueden promover la supervivencia de los explantes, ya que previenen la necrosis por oxidación (George *et al.*, 2008; Bairu *et al.*, 2009).

El medio de cultivo también afectó la supervivencia de los explantes. El agar puede afectar el crecimiento y desarrollo de los tejidos (Scholten y Pierik, 1998), los problemas más comunes que puede generar son hiperhidratación y necrosis (Pierik *et al.*, 1997). En el presente trabajo, en el segundo experimento en medio semi-sólido, donde la concentración del agar era del 0.8%, la supervivencia de los explantes fue mayor que en el primer experimento, donde la concentración de agar fue del 0.6%. La mayor supervivencia de los explantes del segundo experimento pudo deberse a que la mayor concentración del agar posiblemente tuvo un efecto positivo en el desarrollo de los explantes, pero esto no puede saberse con certeza, porque existió otra variable que influyó en la supervivencia, y fue que en el segundo experimento los explantes tenían un mes más de haberse sembrado, la edad fisiológica es uno de los factores que pueden influir en las respuestas de los explantes (George *et al.*, 2008).

En general, la supervivencia de los explantes de *B. purpusii* sembrados en medio líquido expuestos a tratamientos por pulsos, fue menor que la registrada en medio semi-sólido, esto pudo haber ocurrido porque, a pesar de que el medio líquido estaba en agitación constante para promover la aeración, la cantidad de oxígeno que llega a los explantes pudo ser reducida. Cuando existe poco oxígeno, se promueve la formación de gases volátiles como el etileno y el CO₂, los cuales causan un estrés oxidativo que afecta la fisiología y morfología de los explantes, pudiendo causar su oxidación (George *et al.*, 2008; Bairu *et al.*, 2009).

La siguiente etapa de la micropropagación es la inducción de brotes. *B. purpusii* y *B. compacta* formaron brotes por medio de organogénesis directa, es decir, sin pasar por la fase de

tejido calloso. De igual forma, Samyn (1993); Sajeva *et al.* (1994), Osorio y Mata (2005) y Bettaieb *et al.* (2008), reportaron la formación de brotes múltiples de especies de *Beaucarnea* por medio de organogénesis directa.

La formación de brotes normales a partir de explantes de ambas especies estuvo determinada por la concentración y tipo de citocinina y por el medio de cultivo empleado. Los brotes normales se registraron a partir del primer mes de la siembra al término de la fase de inducción, pero a lo largo de la fase de elongación, cuando ya no se adicionaron las citocininas al medio de cultivo, la formación de brotes continuó. Esto se deba a que las células adquieren competencia celular en la fase de inducción y esta continua durante algunos subcultivos (George *et al.*, 2008).

La citocinina BA ya había sido utilizada por otros autores para inducir la formación de brotes de especies de *Beaucarnea*. En el presente trabajo, los explantes de *B. purpusii* sembrados en medio de cultivo adicionado con BA formaron entre 3 y 8 brotes. Este promedio fue similar al obtenido por Osorio y Mata (2005), en su trabajo reportaron un promedio de 11 brotes a partir de explantes de *B. recurvata* y de 8 brotes a partir de explantes de *B. gracilis*. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Sajeva *et al.* (1994) y por Bettaieb *et al.* (2008), quienes registraron un promedio de 6.7 y 6 brotes respectivamente a partir de explantes de *B. recurvata*. A diferencia de estos resultados, los explantes de *B. compacta* sembrados en medio de cultivo semi-sólido adicionado con BA formaron un promedio de hasta de 23.6 brotes normales, el cual fue mucho mayor al obtenido por las otras especies, lo que indica que el potencial regenerativo de esta especie, bajo estas condiciones, es mucho mayor.

Este es el primer trabajo que utiliza TDZ para la propagación de especies de *Beaucarnea*. El promedio de brotes normales de *B. purpusii* inducidos por el TDZ llegó a ser hasta de 40.2 brotes por explante. Estos resultados superan a los promedios de brotes formados por otras especies del género cuando se sembraron en tratamientos adicionados con BA (Samyn 1993; Sajeva *et al.*, 1994; Osorio y Mata, 2005 y Bettaieb *et al.*, 2008). Los mejores tratamientos de TDZ fueron los que se adicionaron con las menores concentraciones, porque fueron los que indujeron la mayor formación de brotes normales, además, es preferible utilizar bajas concentraciones de citocininas por razones económicas y porque altas concentraciones de reguladores pueden causar estrés oxidativo y variación somaclonal (Cassells, 2000).

La formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes formados previamente no se había reportado en otras especies de *Beaucarnea*. Los brotes adventicios al ser separados de

la planta madre y ponerse en contacto directo con el medio de cultivo se desarrollaron en plántulas completas, con lo que el número de brotes de *B. purpusii* inducidos por el TDZ aumentó considerablemente. Se ha reportado en otros trabajos que una de las ventajas del TDZ es su capacidad de inducir la formación de brotes adventicios, ya que promueve la división celular (Lu, 1993; Murthy *et al.*, 1998). Por otro lado, una desventaja del TDZ es que en algunas especies los brotes formados pueden crecer cortos en longitud, muy juntos y podrían tener dificultades para elongarse y enraizar (Lu, 1993; Murthy *et al.*, 1998; George *et al.*, 2008), en el presente trabajo, los brotes inducidos por TDZ en los primeros meses estaban muy juntos, pero el problema se resolvió cuando los brotes fueron divididos y subcultivados, ya que los brotes al tener mayor espacio crecieron y se consolidaron y no fue necesario hacer uso de otras técnicas ni de otros reguladores del crecimiento.

La citocinina KIN no se fue efectiva para la micropropagación de *B. purpusii*, pues el promedio de los brotes inducidos fue muy bajo. Pero una de las ventajas de la KIN fue que la calidad de los brotes formados fue mayor y se desarrollaron más rápido, además la mayoría de los brotes formaron raíces desde la fase de elongación y no fue necesaria la etapa de enraizamiento. Estas características de la KIN también fueron descritas por Samyn (1993) cuando cultivo explantes de *B. recurvata* en medio de cultivo con esta citocinina.

Otros trabajos también han comparado la acción de diferentes citocininas en la formación de brotes de algunas especies suculentas, y también encontraron que el TDZ fue la citocinina más efectiva para inducir la mayor formación de brotes. Attal-Alla y Van Staden (1997), encontraron que TDZ fue más efectivo que BA para la propagación de *Yucca aloifolia*. Pelah *et al.* (2002) mencionan que el TDZ ha sido la citocinina más efectiva para la inducción de brotes de *Selenicereus megalanthus*.

Los tratamientos por pulsos también indujeron la formación de brotes normales a partir de explantes de *B. purpusii*. Una de las hipótesis del presente trabajo era que los tratamientos por pulsos iban a inducir mayor formación de brotes normales que los tratamientos en medio semi-sólido, debido a que en ocasiones dar un pulso de un regulador del crecimiento a concentraciones relativamente altas puede ser igual o más efectivo que una baja concentración que se presenta de manera continua (Thomas y Tranvan, 1982). En contraste, se consiguió una mayor formación de brotes normales a partir de explantes de *B. purpusii* cuando se sembraron en medio semi-sólido. Por lo tanto, en el presente trabajo se rechazó la hipótesis de los tratamientos por pulsos. Los resultados obtenidos fueron diferentes a los obtenidos por Ramírez-

Malagón *et al.* (2008), ellos encontraron que explantes de *Agave tequilana* formaron un mayor promedio de brotes cuando se sometieron a tratamientos por pulsos que cuando se sembraron en medio semi-sólido. También los resultados difirieron a los reportados por Goldfarb *et al.*, (1991), ellos encontraron que al someter cotiledones de *Pseudotsuga menziesii* a tratamientos por pulsos de BA y TDZ formaron mayor promedio de brotes que cuando los explantes se sembraron en medio de cultivo semi-sólido. Pero los resultados concuerdan con los obtenidos por Ramírez-Malagón *et al.* (2008) donde *Agave salmiana*, *A. duranguensis*, *A. pigmaea*, *A. oscura* y *A. victoriareginae* formaron mayor número de brotes en medio semi-sólido que en los tratamientos por pulsos.

En los tratamientos por pulsos, tanto el tiempo de exposición como las concentraciones del regulador utilizadas afectaron la formación de los brotes normales. Al aumentar mucho el tiempo de exposición, los reguladores del crecimiento podrían producir el efecto contrario e inhibir la formación de los brotes. En el presente trabajo, en la mayoría de los casos, el mayor tiempo de exposición, 96 h., provocó una disminución en la formación de brotes normales. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Ramírez-Malagón *et al.* (2008) lograron la propagación de *Agave tequilana* por medio de tratamientos por pulsos de 2.3, 4.5, 6.8 y 9 μM de 2,4-D durante 1, 3 y 6 días, en su trabajo se describe que los explantes expuestos a 6.8 μM de 2,4 -D durante 3 días fueron los que formaron el mayor total de brotes, y al incrementar el tiempo a 6 días, la formación de los brotes disminuyó.

Uno de los problemas encontrados en este trabajo fue la hiperhidratación. En ocasiones, la hiperhidratación provocaba la pérdida total de los explantes, en otros casos se formaban brotes hiperhidratados a partir de explantes normales. Los brotes hiperhidratados no fueron viables y eventualmente necrosaron, estos brotes no se sacaron a condiciones *ex vitro* pues no se consolidaron ni formaron raíces. La pérdida de los brotes hiperhidratados ocurre porque al ser subcultivados se dañan y en unos casos mueren por la aparente necrosis de los meristemas primarios (Kevers *et al.*, 2004), también pueden morir por un problema en la regulación de los estomas, lo cual no permite que puedan sobrevivir en condiciones *ex vitro* (Cassells, 2000).

B. purpusii fue más susceptible a la hiperhidratación, pues el promedio de los brotes hiperhidratados en todos los tratamientos fue mucho mayor que el obtenido a partir de explantes de *B. compacta*. La hiperhidratación está muy relacionada con la especie, la genética del individuo, los niveles endógenos de algunas fitohormonas, con algunos reguladores del

crecimiento, el tipo y concentración del agar (Gaspar *et al.*, 1996; Scholten y Pierik, 1998; Cassells y Curry 2001; Kevers *et al.*, 2004; Olmos, 2010).

En el presente trabajo, las citocininas y el medio de cultivo utilizado afectaron la hiperhidratación. Las citocininas utilizadas indujeron la formación de brotes hiperhidratados tanto de *B. purpusii* como de *B. compacta*, y mientras mayor fue la concentración utilizada, la formación de brotes hiperhidratados también aumentó. Estos resultados concuerdan con los de Bairu *et al.* (2007), ellos observaron que BA, KIN y Z indujeron la formación de brotes hiperhidratados en *Aloe polyphylla* y mientras mayor fue la concentración utilizada mayor fue la formación de brotes hiperhidratados, para evitar la hiperhidratación de los brotes estos autores sustituyeron las citocininas empleadas con metatopolin (mT), una citocinina aromática, con esto evitaron por completo la hiperhidratación.

Las citocininas no fueron el único factor que indujo la hiperhidratación, ya que también se registraron brotes hiperhidratados en los tratamientos control, el medio de cultivo utilizado también propició la hiperhidratación. Como medida para evitar la hiperhidratación, se repitió el experimento utilizando una mayor concentración del agar, de 0.6% a 0.8%. Algunos autores han reportado que aumentar la concentración del agar puede disminuir la formación de brotes hiperhidratados debido a que se reduce la humedad relativa y el potencial osmótico del medio de cultivo (Smith y Spomer, 1995; Kevers, 2004; George *et al.*, 2008; Ivanova y Van Staden 2011).

Al incrementar la concentración del agar a 0.8% en el segundo experimento, se disminuyó considerablemente la formación de los brotes hiperhidratados de *B. purpusii*, pero no evitó su formación por completo. La desventaja de incrementar la concentración de agar, fue que la formación de brotes normales y de brotes adventicios formados a partir de hojas de brotes inducidos por el TDZ disminuyó. La concentración del agar cambia la consistencia del medio de cultivo y esto influye en la capacidad de las plantas para absorber los nutrientes. Incluso pequeños cambios en la composición del agar podría afectar las respuestas morfogénicas de las plantas (Ziv, 1991; Smith y Spomer, 1995). Estos resultados concuerdan con los de Ivanova y Van Staden (2011), quienes encontraron que al incrementar la concentración del agente solidificante a 16 g/L la formación de brotes hiperhidratados en *Aloe polyphylla* disminuyó casi por completo, pero como efecto negativo la regeneración de los brotes también disminuyó. También coinciden con los resultados reportados por Debergh *et al.* (1983), estos autores reportaron que al incrementar la concentración del agar evitaron hiperhidratación de los brotes de *Cynara scolymus*, pero la proliferación de brotes disminuyó.

La mayor concentración de agar disminuyó la formación de brotes normales inducidos por el TDZ; sin embargo, no afectó la formación de los brotes inducidos por BA y KIN, al contrario, en el segundo experimento, el promedio los brotes normales inducidos por BA y KIN fue un poco mayor. Hasta donde se sabe, no se había reportado en otros trabajos que el agar tenga mayor efecto sobre la acción del TDZ que sobre otras citocininas. La estructura química de las citocininas es diferente, TDZ es una citocinina de base fenilurea, en cambio BA y KIN son de base purinas (George, *et al.*, 2008), posiblemente el agar utilizado influyó más en el TDZ que sobre las citocininas que tenía una base diferente. Otra posibilidad fue que la edad fisiológica de los explantes utilizados en cada tratamiento era un poco diferente, este factor puede influir mucho en las respuestas morfogénicas del explante (George, *et al.*, 2008). Toivonen y Karthe (1988) encontraron que los cotiledones de plántulas de *Pinus glauca* formaban brotes más fácilmente cuando tenían entre 7 y 8 días de haber germinado, en cambio después de los 8 días la producción de brotes disminuía considerablemente.

Además de incrementar la concentración del agar, otra medida que se utilizó para intentar disminuir la hiperhidratación de explantes de *B. purpusii* fueron los tratamientos por pulsos. En estos tratamientos los explantes sólo se encuentran en contacto con las citocininas por periodos cortos de tiempo, disminuir el tiempo de exposición a los reguladores puede disminuir la posibilidad de hiperhidratación y otras malformaciones (Smith y Spomer, 1995; Moncaleán *et al.*, 2001). Sin embargo, los explantes sembrados en medio de cultivo líquido también formaron brotes hiperhidratados. En el medio líquido los explantes se encuentran constantemente sumergidos y por lo tanto hay mayor disponibilidad de agua y de los componentes del medio de cultivo (Ziv, 1991; George *et al.*, 2008), lo que podría aumentar la posibilidad de hiperhidratación. En la fase de inducción en los tratamientos por pulsos, los explantes estuvieron en agitación constante para promover la aeración del medio líquido, ésta es otra alternativa para evitar al hiperhidratación (Smith y Spomer, 1995), pero posiblemente los explantes necesitaron más aeración o estar por periodos más cortos de tiempo en la fase de inducción para disminuir la hiperhidratación.

Además de incrementar la concentración del agar y disminuir el tiempo de la fase de inducción, existen otras estrategias para evitar la hiperhidratación, Moebius-Goldammer *et al.* (2003), controlaron la hiperhidratación de brotes de *Ariocarpus kotschoubeyanus* utilizando Sun Caps®, una membrana de polipropileno con un filtro que permite el intercambio de gases, para sellar los frascos. Santos-Díaz *et al.* (2003) disminuyeron la concentración de BA y KIN para evitar la hiperhidratación de *Pelecypora aselliformis*.

El proceso de micropropagación termina con la fase enraizamiento y de aclimatación. Ninguna de las dos especies utilizadas en este trabajo presentó problemas para enraizar, pues en todos los medios de cultivo probados los brotes formaron raíces. El tratamiento de procedencia no afectó el enraizamiento de los brotes, ya que el efecto de los reguladores se va perdiendo en los subcultivos, además el carbón activado elimina los restos de los reguladores del crecimiento (Pan y Van Staden, 1998). Los brotes de *B. purpusii* enraizaron más rápido en el medio de cultivo MS adicionado con 1 g/L de carbón activado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Osorio y Mata (2005), en donde los brotes de *B. gracilis* y *B. recurvata* enraizaron sin problema cuando fueron sembrados en medio de cultivo adicionado con carbón activado. En cambio, para *B. compacta* el enraizamiento fue más efectivo cuando no se adicionó carbón activado al medio de cultivo. Sajeva *et al.* (1994) y Samyn (1993) reportaron que las raíces de los brotes de *B. recurvata* se desarrollaron rápidamente en medio de cultivo MS y ambos autores mencionan que se desarrollaron más raíces cuando adicionaron ANA. En cambio, en el trabajo de Bettaieb, *et al.* (2008), los brotes de *B. recurvata* no enraizaron fácilmente por lo que utilizaron medio de cultivo MS50 adicionado con diferentes concentraciones de β -ciclodextrina, con lo que lograron el enraizamiento.

La fase de aclimatación es la última del proceso de micropropagación, y en el presente trabajo se logró con éxito. Cuando las plántulas estaban bien definidas como plántulas, tuvieron una supervivencia del 100%. Esto también concuerda con el trabajo de Osorio y Mata (2005), en el cual reportaron que las plántulas obtenidas de *B. gracilis* y *B. recurvata* tuvieron porcentajes altos de supervivencia *ex vitro* mayores al 80%. También son similares a los resultados obtenidos por Samyn (1993), quien también reportó éxito en la fase de aclimatación, este autor menciona que, a diferencia de otras plantas obtenidas *in vitro*, las plantas de *B. recurvata* no deben ser sometidas a una humedad demasiada alta o podrían dañarse.

Importancia y perspectivas

El presente trabajo representa una gran importancia pues existen pocos trabajos reportados sobre el género *Beaucarnea* y los trabajos en cultivos de tejidos vegetales son muy reducidos y se enfocan a pocas especies. Este protocolo contribuye a la conservación y uso sustentable de *B. purpusii* y *B. compacta*, las cuales se encuentran en grave peligro de desaparecer.

A partir de un solo explante se llegaron a producir más de 40 plántulas, por lo tanto de una semilla se pueden obtener alrededor de 80 plántulas. Las plántulas enraizan y se aclimataron con éxito, por lo que es posible terminar la fase de micropropagación para los brotes formados y la mayor parte de las plántulas son viables.

Estos resultados son muy relevantes para una especie en peligro de extinción, pues al incrementar el material vegetal se produce un efecto inmediato en la conservación de las especies, pues reduce la necesidad de colecta. Las plántulas formadas se pueden utilizar para fines de investigación, además se pueden hacer planes para una futura comercialización legal, para la formación de jardines botánicos o para reintroducir los ejemplares a su hábitat natural.

La metodología aquí descrita puede ser mejorada, pues si se logra controlar la oxidación y evitar la hiperhidratación, el promedio de las plántulas regeneradas podría ser mucho mayor. Para controlar la oxidación se recomienda utilizar plántulas más grandes, o bien, hacer uso de algún antioxidante en el medio de cultivo. Para evitar la hiperhidratación se recomienda utilizar otros tipos, concentraciones de agar y otras citocininas, y si esto no es suficiente se podría utilizar algún agente osmótico.

CONCLUSIONES

Las semillas de *Beaucarnea purpusii* y *B. compacta* tuvieron porcentajes de germinación *in vitro* mayores al 90% en medio de cultivo MS semi-sólido.

Los explantes de *B. purpusii* sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido y líquido adicionado con TDZ presentaron mayor supervivencia que los sembrados en medio de cultivo adicionado con los otros reguladores y el tratamiento control.

Los explantes de *B. compacta* sembrados en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con BA presentaron mayor supervivencia que los sembrados en tratamiento control.

Entre mayor fue la concentración del BA mayor fue la supervivencia de los explantes.

Las respuestas morfogénicas de los explantes de *B. purpusii* y de *B. compacta* estuvieron determinadas por el tipo, concentración de las citocininas y el medio de cultivo utilizado, y fueron la formación de brotes hiperhidratados y brotes normales por medio de organogénesis directa.

Las citocininas y el medio de cultivo ensayado promovieron la formación de brotes hiperhidratados. El TDZ fue la citocinina que indujo los mayores promedios de brotes hiperhidratados.

La concentración de 0.8% de agar disminuyó la formación de brotes hiperhidratados en todos los tratamientos, y disminuyó la formación de brotes normales en los tratamientos adicionados con TDZ.

Los tratamientos en medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.8% de agar indujeron menor formación de brotes hiperhidratados que los tratamientos en medio de cultivo con 0.6% de agar.

La formación de brotes normales inducidos por TDZ fue mayor en el medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con 0.6% de agar que en el adicionado con 0.8% de agar. La mayor concentración del agar no afectó la formación de brotes normales inducidos por BA y KIN.

La citocinina TDZ fue la más efectiva para la inducción de los brotes normales de *B. purpusii* tanto en medio semi-sólido como en los tratamientos por pulsos. El TDZ fue la única citocinina que indujo la formación de brotes adventicios a partir de hojas de brotes de *B. purpusii*.

El medio semi-sólido fue más efectivo que los tratamientos por pulsos para la propagación de *B. purpusii*, pues fue donde se registró la formación del mayor número de brotes normales.

El tratamiento más efectivo para la propagación de *B. 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 con respuesta.

El tratamiento adicionado con 0.1 mg/L de TDZ y 6% de agar fue el que indujo la mayor formación de brotes adventicios a partir de hojas.

El tratamiento más efectivo para la propagación de *B. 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 con respuesta.

Las dos especies estudiadas desarrollaron raíces en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. El tratamiento más efectivo para la formación de raíces de *B. purpusii* fue medio MS adicionado con 0.5 g/L de carbón activado y para *B. compacta* fue el medio MS50 sin carbón activado.

La fase de aclimatación se logró con éxito para ambas especies, logrando supervivencias del 100%.

REFERENCIAS

1. Arce-Montoya, M. Hernández-González, J. Rodríguez-Álvarez, J. Robert, M. 2007. No correlation between the growth of *in vitro* cultured *Yucca valida* clones and the growth of their mother plants in the field. *PlantCellTiss.Org.* 88: 35-40.
2. Arce-Montoya, M. Rodríguez-Álvarez, J. Hernández-González, J. Robert, M. 2006. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant Cell Rep.* 25: 777-783.
3. Arndt F. Rush, R. Stillfried, H. 1976. SN49537, a new cotton defoliant. *Plant Physiol.* 57, 599. De: George, E. Hall, M. De Klerk, *et al.*, (eds.). 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The background.* Springer. 504 pp.
4. Atta-Alla, H. Van Staden, J. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. *Plant Cell, Tiss.Org.* 48: 209-212, 1997.
5. Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agro. Meso.* 20(1): 153-175.
6. Bairu, M. Kane, E. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant growth Regul* pp. 1-3. 63(2).
7. Bairu, M. Stirk, A. Van Staden, J. 2009. Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Tiss. Org.* 98:239-248.
8. Bairu, M. Stirk, W. Dolezal, K. Van Staden, J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Tiss. Org.* 90: 15-23
9. Bettaieb, T. Mhamdi, M. Hajlaoui, I. 2008. Micropropagation of *Nolina recurvata* Hemsl.: β -Cyclodextrin effects on rooting. *Sci. Hort.* 117(4): 366-368.
10. Bernardi, G/L Hooykaasm P. Hall, M. Libbenga, K. (eds). 1999. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. Els. Vol 33.* 541 pp.
11. Cardone, S. Olmos, S. Echenique, V. Variación somaclonal. En: Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. Mroginski, L. (eds.) 2010. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Parte II. Métodos para generar y analizar diversidad. Capítulo 5: Variación somaclonal.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 229-242.
12. Cassells, A. Curry, R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss. Org.* 64:145-157.
13. Castillo-Gómez, H. Hernández Sandoval, L. 2011. Estado poblacional de *Beaucarnea inermis* (S. Watson) Rose (Nolinaceae) en San Luis Potosí y Tamaulipas. Facultad de Ciencias Naturales / Universidad Autónoma de Querétaro.
14. Cline, M. 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* 90: 230-23.
15. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR)-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2009. *Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas. Manual práctico.* 17-18 pp.
16. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. *Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la Biodiversidad.* México.
17. Contreras, A. Osorio, M. Equihua, M. Benítez, G. 2008. *Conservación y aprovechamiento de Beaucarnea recurvata, especie forestal no maderable.* Laboratorio de Ecología Aplicada, Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México. Cuadernos de Biodiversidad.
18. De Klerk, G. Arnholdt-Schmitt, B. Lieberei, R. Neumann, K. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol. Plantarum* 39(1): 53-66.
19. Debergh, P. Zimmeraman (eds). 1991. *Micropropagation Technology and Application.* Kluwer Academic Publishers. 228 pp.
20. Debergh, C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
21. Eguiarte, L. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Bol. Soc. Bot. México* 56: 45-56.

22. Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity. Florent In Vitro Cell. Dev. B. 47:5-16.
23. Fay, M. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In Vitro Cell. Dev. B. 28:1-4.
24. Fay, M. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodivers. Conserv. 3:176-183.
25. Gaspar, T. Kevers, C. Penel, C. Greppin, H. Reid, D. Thorpe, T. 1996. Review: Plant hormones and plant regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Dev. B. 32: 272-289.
26. George, E. Hall, M. De Klerk, G. (eds.). 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The background. Springer. 504 pp.
27. Goldfarb, B. Howe, G. Bailey, L. Strauss, S. Zaerr, J. 1991. A liquid cytokinin pulse induces adventitious shoot formation from Douglas-fir cotyledons. Plant Cell. Reports. 10: 156-160.
28. Goldstein, J. 2000. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press. Florida, USA.
29. Golubov, J. Mandujano, M. Arizaga, S. Martínez-Palacios, A. Koleff, P. 2007. Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae. Centro de investigaciones científicas de Yucatán.
30. Gratton, J. y Fay, M. 1990. *In vitro* propagation of succulent plants. Chapter 13. Vol. 111. Plant Cell Culture Protocols. Human Press. Methods Mol Biol. 6:219-25.
31. Hernández, L. 2001. Conservación y Manejo de las Especies de *Beaucarnea* (Nolinaceae) en México. Informe técnico final del proyecto.
32. Hernández, L. Zamudio, S. 2003. Two new remarkable Nolinaceae from Central Mexico. Brittonia. 55(3):226-232.
33. Hernández, L. Martínez, M. Malda, G. Osorio, M. Contreras A. Orellana, R. 2009. Las Patas de Elefante (*Beaucarnea* spp.) como recurso fitogenético disponible en México. Red Pata de Elefante. Universidad Autónoma de Querétaro. Instituto de Ecología. A.C.
34. Hernández, L. Osorio-Rosales, M. Orellana, R. Martínez, M. Pérez, M. Contreras, A. Malda, G. Espadas, C. Almanza, K. Castillo, H. Félix, A. 2012. Manejo y conservación de las especies con valor comercial de pata de elefante (*Beaucarnea*). Universidad Autónoma de Querétaro. México. 151 pp.
35. Hunter, M. Gibbs, J. 2007. Fundamentals of Conservation Biology. Blackwell. 497 pp.
36. Irish, M. Irish, G. 2000. Agaves, Yuccas, and Related Plants: a gardener's guide. Timber Press. 384 pp.
37. Ivanova, M. Van Staden, J. 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell. Tiss. Org. 104: 13-21.
38. Kant, V. Chandra, P. Singh, L. Kumar, R. Dhyani, D. Ram, A. 2009. Propagation Through Rooting of Stem Cuttings of *Ginkgo biloba* Linn. - A Living Fossil Under Threat. Journal Am. Sci. 5(5):139-144.
39. Kevers, C. Franck, T. Strasser, R. Dommès, J. Gaspar, T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tiss. Org. 77: 181-191.
40. Leifert, C. Cassells, AC. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro CellDev.Pl. 37:133-138.
41. Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell. Dev. B. 29:92-96.
42. Martínez, M., Pacheco, J. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. Agronomía Colombiana. 24(2): 207-213.
43. Mederos-Molina, S. Varela, C. 2001. Biotecnología vegetal: Obtención de plantas *in vitro*. <http://webpages.ull.es/users/apice/pdf/311-086.pdf>.
44. Moebius-Goldammer, K. Mata-Rosas, M. Chávez-Ávila, V. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. In Vitro Cell. Dev. B. 39:388-393.
45. Moncaleán, P. Rodríguez, A. Fernández, B. 2001. In vitro response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods. Plant Cell. Tiss. Org. 67: 257-266.
46. Mroginski, L. Sansberro, P. Flaschland, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. Mroginski, L. (eds.) 2010. Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Parte I Herramientas básicas. Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 17-25.

47. Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
48. Murthy, B. Murch, S. Praveen, S. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. B.* 34: 267-275.
49. Norizaku, T. Tanimoto, D. Harada, H. 1985. Effects of wounding on adventitious bud formation in *Torenia fournieri* stem segments cultured *in vitro*. En: George, E. Hall, M. De Klerk, G. (eds.). 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The background.* Springer. P. 360.
50. Olmos, S. Luciani, G. Galdeano, E. Micropropagación. En: Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. Mroginski, L. (eds.) 2010. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Parte IV Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo 1: Micropropagación.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 235-262.
51. Osorio, M. Contreras, A. Equihua, M. Benítez, G. 2011. Conservación y aprovechamiento de la palma monja, *Beaucarnea recurvata* (Lemaire), especie forestal no maderable. CONAFOR e INECOL A.C. 42pp
52. Osorio-Rosales, M. y Mata-Rosas, M. 2005. Micropropagation of Endemic and Endangered Mexican Species of Pinnate Palms. *Hortic. Sci.* 40(5): 1481-1484.
53. Osorio, M. Contreras, A. Equihua, M. Benítez, G. 2008. Pata de elefante. *Ciencia y desarrollo.* 34: 223-68.
54. Pan, M. Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant growth Regul.* 26: 155-163.
55. Paunescu, A. 2009. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. *Rom. Biotech. Lett.* 14 (1): 4095-4103.
56. Pelah, D. Kaushik, A. Mizrahi, Y. Sitrit, Y. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 71: 81-84.
57. Pence, V. 2010. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin.* 65: 539–547.
58. Pence, V. 2011. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell. Dev. B.* 47:176–187.
59. Pierik, O. Oosterkamp, J. Manschot, G. Barth, T. Scholten, H. 1997. Agar brand- A dominating factor for shoot growth of juvenile and adult *Quercus robur* L. "Fastigiata" *in vitro*. En: Scholten, H. Pierik, R. 1998. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Sci. Hort.* 77: 109-116.
60. Possiel, W. Saunier, R. Meganck, R. 1995. Conservation of Biodiversity and the New Regional Planning. Chapter 2. *In-situ* conservation of biodiversity. De: <http://www.oas.org/dsd/publications/Unit/oea04e/oea04e.pdf>
61. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). 2010. Pérdida de Biodiversidad. De: <http://www.profepa.gob.mx/>.
62. Quoirin, M. Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 78:437-422.
63. Radice, S. Morfogénesis. En: Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. Mroginski, L. (eds.) 2010. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Parte I Herramientas básicas. Capítulo 2: Morfogénesis.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 26-33.
64. Ramírez-Malagon, R. Aguilar-Ramírez, I. Borodanenko, A. Pérez-Moreno, L. Barrera-Guerra, H. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo, N. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. B.* 43:660-665.
65. Ramírez-Malagón, R. Borodaneko, A. Pérez-Moreno, L. Salas-Araiza, M. Nuñez-Palenius, H. Ochoa-Alejo, N. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell. Org. Cult.* 94: 201-207.
66. Ranal, M. García, D. 2006. How and why to measure the germination process? *Rev. bras. Bot.* 29(1).
67. Reed, B. Sarasan, V. Kane, M. Bunn. Pence, V. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell. Dev. B.* 47:1-4.
68. Roca, W. y Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 969pp.

69. Rzedowsky, J. 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
70. Sajeve, M. Carimi, F. Giulio, F. 1994. In vitro propagation of a clone of *Nolina recurvata* (Lem.) Hemsley (Agavaceae). *Plan Biosystems*. 128(1): 266 -271.
71. Samyn, G. 1997. Micropropagation of *Beaucarnea recurvata* Lem. Syn. *Nolina recurvata* (Lem.) Hemsl. (Ponytail Palm). Editado por Bajaj. *Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation VI*. Springer. Alemania.
72. Santos-Díaz, M. Méndez-Ontiveros, R. Arredondo-Gómez, A. Santos-Díaz, M. 2003. *In vitro* organogénesis of *Pelecypora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell B*. 39:480:484.
73. Sarasan, V. Cripps, R. Ramsay, M. Atherton, C. McMichen, M. Prendergast, G. Rowntree, J. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. B*. 42 (3):206-214.
74. Sarasan, V. 2010. Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes Worldwide. *Viswambharan Sarasan. Kew Bulletin*. 65:549–554.
75. Scholten, H. Pierik, R. 1998. Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. *Sci. Hort*. 77: 109-116.
76. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos naturales (SEMARNAT). 2011. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México.
77. Skirvin, R. Motoike, S. Norton, A. Ozgur, M. Al-Juboory, A. McMeans, M. 1999. Workshop on Micropropagation Establishment of Contaminat Free Perennial Plants *In Vitro*. *In Vitro Cell. Dev. B*. 35(4):278-280.
78. Smith, R. 2000. *Plant Tissue Culture Techniques and experiments*. Academic Press. 2^o Edition. 231 pp.
79. Smith, M. Spomer, A. 1995. Vessels, gels, liquid media, and support Systems. En: Aitken-Christie, J. Kozai, T. Smith, M. (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer, Dordrecht. Pp 371-404.
80. Stevens, P. 2010. Angiosperm Phylogeny Website. Versión 9, Junio 2008. De: <http://mobot.org/mobot/research/apweb/>
81. Tellería, J. 1999. Biología de la conservación: balance y perspectivas. *Ardea* 46(2) 239-248.
82. Thomas, D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv*. 26: 618-631.
83. Thomas, D. Tranvan, H. 1982. Influence relative de la BAP et de l'IBA sur a néoformation de bourgeons et de racines sur les plantules du *Biota orientalis* (Cupressacées). En George, E. Hall, M. De Klerk, G. (eds.). 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The background*. Springer. 504 pp.
84. Toivone, P. Kartha, K. 1988. Regeneration of plantlets from *in vitro* cultured cotyledons of white spruce (*Picea glauca* Moench Voss.) En: George, E. Hall, M. De Klerk, G. (eds.). 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The background*. Springer. 504 pp.
85. Yepes, L. Aldwinckle, H. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *PlantCellTissOrg*. 37: 257-269.
86. Ziv, M. 1991. Quality of Micropropagated Plants – Vitrification. *In Vitro Cell B*. 27:64-69.