



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS DE
PROPAGACIÓN VEGETATIVA *in vivo* E *in vitro*
DE *Echeveria laui* (CRASSULACEAE)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL VERASTEGUI VIDAL

DIRECTOR: DR. JUAN GERARDO ORTÍZ MONTIEL



TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DEDICATORIA:

A mis padres:

*Addy Vidal Méndez
Miguel Angel Verastegui Ramírez*

*Quienes me han motivado toda la vida
y
son el motor que impulsa el cumplimiento de mis metas.*

*Para ustedes
¡¡¡Misión cumplida!!!
Los amo.*

A mi familia:

*Quienes me brindaron su apoyo incondicional
sin dudar en ningún momento
de mi capacidad
para concluir este trabajo*

¡¡¡Los quiero mucho!!!

Al Doctor:

Juan Gerardo Ortiz Montiel

*Quien durante la carrera siempre me apoyó
y me brindó su confianza para
elaborar este trabajo con total libertad*

¡¡¡Gracias Prof. lo quiero mucho!!!

A mis viejos y nuevos amigos:

*Los cuales siempre mantuve en mi corazón
durante la elaboración de este trabajo.*

¡¡¡Gracias por estar siempre junto a mí!!!





AGRADECIMIENTOS

A María del Rocío Reyero Saavedra:

Compañera inteligente y amiga incondicional, así como pieza fundamental en el desarrollo de este trabajo. Gracias por todo, sé que lograras todo lo que te propongas si lo haces con esa determinación que te caracteriza.

A la Doctora Silvia Aguilar:

Por las facilidades que me brindó dentro de su laboratorio y por el apoyo que siempre nos manifestó.

A mis sinodales:

Por las acertadas correcciones y el interés que demostraron hacia este trabajo.

A Tania:

Por apoyarme con la captura de algunas fotografías de este trabajo y demostrar su compañerismo.





AVISO AL LECTOR

Este trabajo es la primera parte del proyecto PAPCA titulado “Multiplicación vegetativa in vivo e in vitro de Echeveria laui, Crasulácea endémica mexicana” si desea mayor información relacionada a esta planta endémica consultar la tesis titulada “Determinación de la dinámica estomática de Echeveria laui (CRASSULACEAE) en individuos obtenidos de propagación vegetativa y sexual”.



INDICE

Resumen	8
Introducción	9
<i>Descripción específica</i>	11
Antecedentes	13
Objetivos	14
Material y Método	
<i>Propagación Vegetativa por Esqueje de Hoja</i>	
Experimento 1. Efecto de luz, humedad, reguladores de crecimiento y su aplicación, en la formación de brotes por esqueje de hoja.	15
Experimento 2. Efecto de los reguladores de crecimiento y su aplicación, sobre la inducción de brote, raíz o ambas.	16
Experimento 3. Determinación de la influencia de la obscuridad, en la inducción de raíz.	18
Experimento 4. Influencia de la temperatura y de las intensidades luminosas sobre la formación de brote.	18
Experimento 5. Influencia del sustrato y la humedad relativa, en la inducción de brote.	19





Experimento 6. Influencia de la luz en el desarrollo de brote o raíz en hojas pequeñas, utilizadas como esqueje.	19
Experimento 7. Proporción del desarrollo de raíces, rosetas, brotes con raíz y callo en esquejes de hoja.	20
<i>Propagación Sexual</i>	21
<i>Propagación por Cultivo in vitro</i>	22
<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>	24
Resultados y Discusión	
<i>Propagación Vegetativa por Esqueje de Hoja</i>	25
Experimento 1. Efecto de luz, humedad, reguladores de crecimiento y su aplicación, en la formación de brotes por esqueje de hoja.	26
Experimento 2. Efecto de los reguladores de crecimiento y su aplicación, sobre la inducción de brote, raíz o ambas.	29
Experimento 3. Determinación de la influencia de la obscuridad, en la inducción de raíz.	30
Experimento 4. Influencia de la temperatura y de las intensidades luminosas sobre la formación de brote.	32
Experimento 5. Influencia del sustrato y la humedad relativa, en la inducción de brote.	33





Experimento 6. Influencia de la luz en el desarrollo de brote o raíz en hojas pequeñas, utilizadas como esqueje.	34
Experimento 7. Proporción del desarrollo de raíces, rosetas, brotes con raíz y callo en esquejes de hoja.	34
<i>Propagación Sexual</i>	36
<i>Propagación por Cultivo in vitro</i>	39
<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>	43
Conclusiones	44
Sugerencias para Trabajos Posteriores	45
Anexos	
<i>Anexo 1 Gráficas</i>	46
<i>Anexo 2 Figuras</i>	50
<i>Anexo 3 Medio MS</i>	60
Abreviaturas	62
Bibliografía	63





RESUMEN

A raíz de la construcción de la Línea de Transmisión Temascal II-Oaxaca Potencia de la Comisión Federal de Electricidad (CFE), la Sociedad Mexicana de Cactología, A.C, ejecutó el proyecto “Rescate de Cactáceas y otras Plantas Endémicas de la Región de Cuicatlán, Oaxaca” y simultáneamente se construyó un vivero de propagación por semillas y esquejes de plantas nativas con fines de reforestación y restauración. Entre las plantas que se propagan en ese vivero, se encuentra la Crasulácea *Echeveria laui*, que se reporta como endémica de la Región de Cuicatlán, Oaxaca. La investigación sobre su reproducción, se restringe a dos artículos, uno realizado en Polonia, enfocado a la propagación *in vitro* de esta especie y el segundo desarrollado en México, donde se elaboro una investigación enfocada a la propagación sexual y vegetativa por esqueje de hoja. Debido a la poca información científica dirigida a esta especie, se enfocó este estudio a propagar mediante reproducción sexual y vegetativa *in vivo* e *in vitro* individuos de *Echeveria laui*. Se determinaron los intervalos de intensidad luminosa, humedad relativa y temperatura, que favorecen el desarrollo de rosetas de *E. laui* en propagación vegetativa, además se determinó la influencia de el sustrato en la formación de rosetas en los esquejes, también se realizaron pruebas de germinación con semillas de la especie para determinar la influencia de la temperatura, intensidad luminosa y tiempo de maduración; asimismo se realizaron medios de cultivo para propagar vegetativamente *E. laui* de manera *in vitro* con mezclas hormonales. En los resultados de propagación vegetativa se observó que los esquejes formaron rosetas en 60 días (60 a 70 %), manteniéndolos en una Humedad Relativa de 28.1~47.4 %, intensidad luminosa promedio de $38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de $23.5 \sim 31.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 6:18 luz/obscuridad. Intensidades luminosas arriba de los $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, representaron un riesgo para el desarrollo de brotes y se concluyó que el sustrato, no fue indispensable para la propagación por esqueje. Las pruebas de germinación revelaron que las semillas son muy sensibles en su viabilidad, a las fluctuaciones de la temperatura y que requiere un tiempo de 280 días de maduración para aumentar el número de semillas germinadas. Los explantes colocados en el medio de cultivo *in vitro*, que se desarrolló para generar callo (VRc) mostraron división celular y crecimiento del tejido en 50 días, el medio para formación de roseta (VRb4), indujo en los explantes el desarrollo de rosetas perfectamente definidas en un lapso de 97 días.





INTRODUCCIÓN

México comprende una de las riquezas biológicas más importantes a nivel mundial, posee alrededor del 10% de la biodiversidad terrestre a nivel mundial (Mittermeier, *et al.* 1992), valor que sobresale incluso de países con límites territoriales similares (Dirzo, *et al.* 1994), también está considerado entre los doce países denominados megadiversos, los cuales en conjunto albergan entre 60 y 70% de la diversidad biológica total del planeta (Mittermeier, *et al.* 1992).

Entre las principales causas que han originado la biodiversidad de México, se pueden resaltar la topografía accidentada del territorio, la variedad de climas y una compleja historia geológica y biológica, entre otras. La interacción de todos estos factores ha contribuido a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que promueven una gran variedad de hábitats y formas de vida (Rzedowski, 1978).

La región de Cuicatlán, se ubica entre las Montañas de la Sierra de Juárez, La Sierra de Huautla, La Sierra de Zongolica y La Sierra de la Mixteca e Ixcateca, al noroeste del Estado de Oaxaca; se incluye en la Cuenca Alta del Papaloapan que se recarga con los ríos Grande, Salado, Las Vuctas y Tomellín. Es considerada una zona árida y semiárida por su baja precipitación pluvial, pero en realidad corresponde a una zona con clima semiárido. Los registros de las estaciones climatológicas marcan para Cuicatlán una temperatura media anual de 25.8 °C y precipitación pluvial de 513.2 mm. Podemos encontrar siete tipos de vegetación en la región de Cuicatlán: Bosque Tropical Caducifolio, Matorral Xerofilo, Bosque Espinoso, Bosque de *Quercus*, Bosque de Coníferas, Bosque Tropical Subcaducifolio, Vegetación Acuática y Subacuática (Reyes, *et al.* 2004).

La provincia florística conocida como Tehuacán-Cuicatlán, esta ubicada en los estados de Puebla y Oaxaca, es considerada mundialmente una de las áreas de mayor biodiversidad, como ejemplo se citan más de 2700 especies de plantas vasculares, muchas de ellas consideradas como





endémicas (Reyes, *et al.* 2004). Acosta (2002) calcula un estimado de endemismo del 22.2% aunque sostiene que datos recientes podrían incrementar este porcentaje.

Por tal motivo se declaró en el Diario Oficial de la Federación el 18 de Septiembre de 1998 una superficie de 490, 186 ha como Área Natural Protegida (ANP) con carácter de Reserva de la Biosfera, que abarca desde la Sierra de Tecamachalco, Puebla, hasta Atatlahuaca en la Cañada Chica, Oaxaca (Reyes, *et al.* 2004).

A raíz de la construcción de la Línea de Transmisión Temascal II-Oaxaca Potencia de la Comisión Federal de Electricidad (CFE), la Sociedad Mexicana de Cactología, A.C, ejecutó el proyecto “Rescate de Cactáceas y otras Plantas Endémicas de la Región de Cuicatlán, Oaxaca” y simultáneamente se construyó un vivero de propagación por semillas y esquejes de plantas nativas con fines de reforestación y restauración (Reyes, *et al.* 2004).

Entre las plantas que se propagan en ese vivero, se encuentra la crasulácea, *Echeveria laui* Moran & Meyrán, la cual de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-059-SEMARNAT-2001” se encuentra catalogada como “en peligro de extinción” lo que la coloca dentro de aquellas especies cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros (esta categoría coincide parcialmente con las categorías de en peligro crítico y en peligro de extinción de la clasificación de la IUCN, 1994; IUCN-CSE, 1999). Se reporta a esta especie como especie endémica a la Región de Cuicatlán, Oaxaca (Reyes, *et al.* 2004).

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



DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA

FAMILIA: Crassulaceae

Las crasuláceas son plantas que poseen hojas, tallos o raíces suculentas. La mayoría de las especies de esta familia son hierbas o arbustos perennes solitarios o cespitosos con hojas dispuestas en forma de roseta. Sus hojas son suculentas, de diferentes tamaños, desde muy pequeñas (2 o 3 mm) hasta muy grandes (más de 30 cm); las cuales pueden presentar superficies cubiertas de papilas, pelos o cera. Presentan inflorescencias con flores generalmente pentámeras (5 sépalos y 5 pétalos). Los géneros mejor representados en México son *Sedum* y *Echeveria*. Algunas de ellas son conocidas comúnmente como “siempre viva”, “oreja de ratón”, “oreja de burro”, “chisme” y “conchitas”. La familia *Crassulaceae* comprende alrededor de 35 géneros y cerca de 1410 especies; en nuestro país crecen alrededor de 340 de ellas, principalmente en zonas áridas, semiáridas y bosques templados. Se distribuyen en todo el mundo (cosmopolita), en regiones cálidas y secas, aunque es posible encontrarlas en ambientes fríos y húmedos. Se distribuyen principalmente en México, Centro y Sudamérica, Sudáfrica y sur de Asia (Reyes, *et al.* 2004).

GÉNERO: *Echeveria* (De Candolle).

Plantas perennes, a veces arbustivas, con raíces fibrosas o a veces engrosadas, fusiformes; tallos simples o ramificados, cortos o alargados; hojas alternas espiralmente, ya sea rosuladas o dispersas, mas o menos carnosas, bordes casi siempre entero, pero a veces lacerados o fimbriados, casi siempre sésiles, pero también con base cuneada, no amplexicaule, una vena en la base de cada hoja, a menudo glaucas o pruinosas. Inflorescencia siempre lateral o axilar, ya sea en cincino, panícula con cincinos, espiga o racimo; el tallo floral con hojas en su parte inferior, nunca cordadas o amplexicaules, en la inflorescencia brácteas abajo de cada flor y una o dos bractéolas o ninguna en los pedicelos, estos cortos o largos; flores con 5 sépalos, 5 pétalos, 5 carpelos y 10 estambres; los sépalos pueden ser de tamaño igual o desigual, extendidos,





ascendentes o apresadores; la corola varía de cilíndrica a conoidea o urceolada, habitualmente con colores brillantes, pétalos gruesos, erectos, imbricados, a veces valvados, aquillados comúnmente por fuera y acanalados en su cara interna, sin apéndices a los lados del filamento epipétalo (excepto en tres especies), carpelos connatos en la base; nectarios grandes que pueden ser truncados, reniformes o semilunares; los folículos comúnmente son divergentes al madurar, las semillas tienen testa lisa o reticulada (Meyrán y López, 2003).

ESPECIE: *Echeveria laui* Moran & Meyrán.

Planta glabra, marcadamente pruinosa, roseta densa de 12-30 cm de diámetro, hojas obovadas, redondeadas, a obtusas, subapiculadas, bordes obtusos, de 5-8 cm de largo, 3-4.5cm de ancho, 6-8 mm de grosor, rojizas o verde oscuro rojizo bajo la pruina. Tallos florales 1-2, de 6-20 cm de longitud, con 5-7 hojas obovadas a elípticas, redondeadas a obtusas, espolonadas, de 11-20 mm de largo; sépalos ascendentes, algo incurvados, triangulares a elíptico-ovados, muy desiguales, el mayor de 16-20 mm de largo; corola piramidal de 13-16mm de largo, 7-8 mm de diámetro en la base, roja pero muy pruinosa, nectarios moteados de rojo. Cromosomas n=15. Localidad tipo: Oaxaca; cañadas laterales del río Salado, Quiotepec. (Meyrán y López, 2003).





ANTECEDENTES

En general en el mundo, se ha realizado realmente poca investigación en esta familia, desde el punto de vista de la taxonomía se ha trabajado en el planteamiento básicamente de una taxonomía morfológica y en los últimos años, también en organismos de ésta familia se han aislado alcaloides y taninos característicos, para desarrollar una quimiotaxonomía (Stevens, *et al.* 1995).

Desde el punto de vista de su cultivo y propagación *in vivo*, pocas especies se han reproducido, como *Kalanchoe blossfeldiana* donde diferentes sustratos y mezclas artificiales junto con reguladores de crecimiento fueron utilizados para evaluar el enraizamiento de estacas apicales (Villanueva, *et al.* 1998) y en *Crassula argentea* fueron evaluadas diferentes intensidades de luz y tratamientos hormonales para obtener la regeneración de individuos a partir de esquejes de hoja (Paterson y Rost, 1979).

En el caso particular de *Echeveria laui*, existe poca investigación, en lo que se refiere a cultivos *in vitro* se ha trabajado con fragmentos de hoja en medio de cultivo MS, suplementado con auxinas y citocininas, (Wojciechowicz, *et al.* 2001). Respecto a la propagación vegetativa *in vivo* Piña-Poujol, *et al.* (2007), sometieron esquejes de hoja de la crasulácea, a diferentes intensidades de luz y cantidad de nutrimentos, para obtener nuevos individuos, además de haber hecho un estudio sobre la capacidad germinativa de la semilla y reintroducción de las plántulas obtenidas a su ambiente natural. Estos autores proponen la propagación vegetativa como un método viable para la conservación de esta especie, pudiendo utilizarse para producir ejemplares de venta y en casos excepcionales para reintroducción y repoblación, debido a que la germinación de las semillas en esta especie es un evento raro.

Tomando en cuenta lo anterior, es de suma importancia encontrar las condiciones ambientales adecuadas de cultivo como intensidades de luz, temperatura, humedad relativa, así como determinar el tratamiento hormonal que haga factible propagar *E. laui*, para lograr la adecuada conservación de esta especie endémica y además en peligro de extinción.



OBJETIVOS

Objetivo general:

Propagar mediante reproducción sexual y vegetativa *in vivo* e *in vitro* individuos de *Echeveria laui*.

Objetivo particular:

- 1) Obtener el método apropiado, para reproducir vegetativamente *Echeveria laui* por medio de esquejes de hoja.
- 2) Determinar el intervalo de luz, temperatura y humedad del sustrato, que favorezca la propagación por esquejes de hoja de *Echeveria laui*.
- 3) Determinar si la aplicación *in vivo* de Ácido Indolbutírico y Bencilaminopurina en esquejes de hoja de *E. laui*, aceleran la propagación.
- 4) Comparar el porcentaje de germinación de semillas de *Echeveria laui*, en luz y temperatura controladas y en condiciones fluctuantes de en un invernadero.
- 5) Comparar el porcentaje de germinación de semillas de *Echeveria laui*, después de un período máximo 280 días de almacenaje.
- 6) Establecer un medio de cultivo *in vitro* adecuado para la obtención de callos y brotes de *Echeveria laui*.



MATERIAL Y MÉTODO

Se trabajó con plantas de *Echeveria laui* provenientes del Vivero “La Iberia”, perteneciente a la Fundación para la Reserva de la Biosfera, Cuicatlán, A. C., Localizado en La Iberia s/n, San Juan Bautista, Cuicatlán, Oaxaca. Con registro UMA: MX/VIV-CO-218-OAX/05.

Estas plantas se depositaron en el invernadero de la Unidad de Morfología y Función de la FES-Iztacala, UNAM.

PROPAGACIÓN VEGETATIVA POR ESQUEJE DE HOJA

Experimento 1. Efecto de luz, humedad, reguladores de crecimiento y su aplicación, en la formación de brotes por esqueje de hoja.

Se propagó *Echeveria laui* vegetativamente por medio de esquejes de hoja, utilizando como sustrato 316 gr de tierra de hoja con tepojal (tamizado por una malla de 0.5cm) 1:1, la mezcla se depositó en 20 cajas de plástico transparente. Sobre el sustrato se colocaron 4 esquejes de hoja por caja, éstos se obtuvieron de la base de la planta adulta (Fig. 1).

Después de tomar las hojas, se les dejó un tiempo de cicatrización de siete días para proceder al tratamiento experimental, esto con el fin de evitar la pudrición al someterlos a un ambiente con humedad.

La intensidad luminosa se midió con un cuantómetro marca Hansatech, modelo Quantum sensor/measuring unit, colocando 10 cajas en dos intensidades de luz (“-LUZ” $0.81\sim 265\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y “+LUZ” $1.795\sim 760\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, Gráfica 1, Fig. 4).

A los grupos denominados “H” se les agregó 130 ml de agua corriente, dejando el sustrato a 41.21 % de su Capacidad de Campo (CC) y los grupos llamados “S” se mantuvieron a 1.95 % CC.

A cada hoja se le sumergió en etanol al 96 % durante 2 min (a excepción de los grupos “Testigo con Cera”), con el fin de retirar la cera que cubre la epidermis de las hojas de *E. laui*.



Se prepararon 2 mezclas con Ácido Indolbutírico (AIB)

Mezcla 1. Talco+AIB a 500 ppm

Mezcla 2. Vaselina+AIB a 500 ppm

y una solución de Etanol al 96 %+AIB a 200 ppm (Cuadro 1).

El AIB se aplicó por medio del “Método de espolvoreado” (Weaver, 1990), que consistió, en espolvorear el esqueje con la mezcla 1. En el caso de la mezcla 2, se ha visto que la vaselina también resulta eficaz (Weaver, 1990), así que se untó ésta en los bordes de las hojas. Finalmente las hojas pertenecientes al tratamiento con solución (Etanol al 96 %+AIB a 200 ppm), se les remojó durante 2 minutos y luego se dejó evaporar el alcohol con el fin de que el regulador de crecimiento se mantuviera adherido en forma de polvo.

El experimento tuvo una duración de 2 meses y se realizó el conteo de los brotes obtenidos al término de este tiempo, es importante mencionar que los lotes “H” fueron cubiertos por una tapa de plástico transparente.

Cuadro 1. Tratamientos del Experimento 1, esquejes de hoja de *E. laui* en dos intensidades de luz, dos condiciones de humedad, tres tratamientos con AIB aplicados con tres vehículos diferentes y dos testigos.

	-LUZ $0.81\sim 265\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$					+LUZ $1.795\sim 760\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$				
H 41.21 % CC	TALCO+AIB 500ppm	VASELINA +AIB 500ppm	ETANOL 96%+AIB 200ppm	TESTIGO CON CERA	TESTIGO SIN CERA	TALCO+AIB 500ppm	VASELINA +AIB 500ppm	ETANOL 96%+AIB 200ppm	TESTIGO CON CERA	TESTIGO SIN CERA
S 1.95 % CC	TALCO+AIB 500ppm	VASELINA +AIB 500ppm	ETANOL 96%+AIB 200ppm	TESTIGO CON CERA	TESTIGO SIN CERA	TALCO+AIB 500ppm	VASELINA +AIB 500ppm	ETANOL 96%+AIB 200ppm	TESTIGO CON CERA	TESTIGO SIN CERA

Experimento 2. Efecto de los reguladores de crecimiento y su aplicación, sobre la inducción de brote, raíz o ambas.

En 18 cajas de plástico con 316 gr de tierra de hoja con tepojal 1:1 (tamizado por una malla de 0.5cm), se depositaron esquejes de hoja de *Echeveria laui* (8 por caja).



Se les dejó cicatrizar durante 7 días la herida provocada al separarlas de la planta adulta y posteriormente se les removió la cera con etanol al 96 % durante 2 min, a excepción de los grupos “Testigo con Cera”.

Se prepararon las siguientes soluciones con hormonas disueltas en agua destilada y se sumergieron durante 60 min (24 esquejes por solución):

1. Ácido Indolbutírico (AIB) a 500 ppm
2. AIB a 1000 ppm
3. bencilaminopurina (BAP) 500 ppm
4. BAP 1000 ppm

Finalmente se utilizaron los grupos llamados “Testigo con Cera” y “Testigo sin Cera” y se les sumergió en agua destilada durante 60 min (24 hojas por grupo).

A los grupos denominados H y HE se les cubrió con tapas de plástico transparente y se les agregó 130 ml de agua corriente, dejando el sustrato a 41.21 % de su Capacidad de Campo (CC) y los grupos “S” se mantuvieron a 1.95 % CC (Cuadro 2).

El experimento duró 60 días y al termino de este tiempo se realizaron los conteos de las raíces, brotes y brotes con raíces obtenidas, además es importante resaltar que las hojas de los grupos HE permanecieron enterradas en el sustrato (Fig. 5) a diferencia de los lotes H y S que se mantuvieron con el envés sobre el sustrato.

Cuadro 2.- Tratamientos de Experimento 2, esquejes de *E. laui* sumergidos durante 1h, en AIB y BAP (1000 y 500ppm) como reguladores de crecimiento y agua destilada como testigo; donde “S” se refiere a esquejes sobre un sustrato seco, “H” esquejes sobre un sustrato húmedo y “HE” a esquejes enterrados en un sustrato húmedo.

INTENSIDAD $0.81\sim 265\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$						
S 1.95 % CC	IBA 500ppm	IBA 1000ppm	BAP 500ppm	BAP 1000ppm	Testigo con cera	Testigo sin cera
H 41.21 % CC	IBA 500ppm	IBA 1000ppm	BAP 500ppm	BAP 1000ppm	Testigo con cera	Testigo sin cera
HE 41.21 % CC	IBA 500ppm	IBA 1000ppm	BAP 500ppm	BAP 1000ppm	Testigo con cera	Testigo sin cera



Experimento 3. Determinación de la influencia de la obscuridad, en la inducción de raíz.

Se colocaron dos cajas de plástico con 10 esquejes de hoja y dos cajas más con 11 esquejes por caja (se dejaron cicatrizar durante siete días y no se les retiro la cera), con una mezcla de sustrato de las mismas características que los experimentos 1 y 2, estas cajas, se dividieron en dos, las que se mantuvieron en un rango de temperatura de 21~23 °C (**Cuarto de cultivo**) y las otras que se colocaron de 9~29 °C (**Invernadero**), las cajas del “**Cuarto de cultivo**” se dividieron en dos, una en intensidad de luz de $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 16:8 luz/obscuridad (con 11 esquejes llamados “LA”) y otra con 10 hojas que se mantuvo a la misma temperatura pero en obscuridad (tapadas con una caja de cartón denominadas “OA”). Las dos cajas restantes se mantuvieron en el “**Invernadero**” de la unidad de morfología y función de la FES-Iztacala (UNAM), las cuales también se dividieron en dos, una se expuso a intensidades luminosas de $0.81\sim 265 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (con 11 esquejes llamados “LI”) y la otra con 10 hojas que se mantuvo en obscuridad tapándola con una caja de cartón a la que se denominó como “OI” (Fig. 6).

El experimento duró 2 meses y al término de este tiempo se realizó el conteo de raíces y brotes.

Experimento 4. Influencia de la temperatura y de las intensidades luminosas sobre la formación de brote.

Se desprendieron 21 hojas de *Echeveria laui*, y se colocaron en 3 charolas de unicel (siete por recipiente), esta vez no se les dejó los 7 días de cicatrización, no se depositaron sobre sustrato, ni se les retiro la cera. Las tres charolas con los esquejes se dividieron en 3 intensidades luminosas y 3 rangos de temperatura:

- 1) **BAJO**, con una intensidad de luz promedio de $21.53 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura que osciló entre los 23 y los 32 °C.
- 2) **MEDIO**, con $90.69 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica promedio y temperaturas de 23~38 °C.
- 3) **ALTO**, con una intensidad luminosa promedio de $373.38 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 23~49 °C de temperatura.



Se colocaron 17 hojas más de *E. laui*, los esquejes se dividieron y se colocaron en las siguientes condiciones:

4) **TEMPERATURA ALTA**, 34~35 °C en oscuridad (10 hojas).

5) **TEMPERATURA BAJA**, 14 °C en oscuridad (7 hojas).

Así mismo 8 esquejes de hoja se mantuvieron en las siguientes condiciones:

6) **FRIO**, con una intensidad de $28 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 14 °C.

El experimento tuvo una duración de 2 meses y al termino de dicho tiempo se realizaron los conteos de brotes y raíces desarrolladas.

Experimento 5. Influencia del sustrato y la humedad relativa, en la inducción de brote.

Se utilizaron 3 cajas de plástico con tapas transparentes y 10 hojas de *E. laui* en su interior.

Estas se dividieron de la siguiente forma:

1) “**H**”, una caja con **sustrato*** y una CC de 41.21 %, con Humedad Relativa de 78.4~92.5%

2) “**S**”, una caja con **sustrato*** y una CC de 1.95 %, con Humedad Relativa de 30.5~36.2%

3) “**N**”, una caja sin sustrato de ningún tipo y una Humedad Relativa de 28.1~47.4%

Además 10 hojas se colocaron de la siguiente forma:

4) “**F**”, sobre una superficie de aluminio sin tapar y una Humedad Relativa de 29~87%

Todos los grupos de hojas (H, S, N y F) se mantuvieron en una intensidad luminosa promedio de $38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, una temperatura de 23.5 ± 1.1 °C (Mínima) ~ 31.1 ± 1.6 °C (Máxima) y un fotoperiodo de 6:18 luz/oscuridad durante 60 días y al concluir este tiempo se realizaron los conteos de brotes y raíces desarrolladas.

Experimento 6. Influencia de la luz en el desarrollo de brote o raíz en hojas pequeñas, utilizadas como esqueje.

Se utilizaron 20 hojas provenientes de rosetas obtenidas de esquejes de hoja (**MEDIANAS**), con un tamaño de 2.5 cm de largo, éstas se depositaron en cajas de plástico con tapas transparentes, **sustrato*** con una CC de 41.21 %, una Humedad Relativa (HR) de 84.6~93.4 %, temperaturas de





25.7±0.6 °C (Mínima) ~ 29.2±0.07 °C (Máxima) y una intensidad lumínica de 1.8 μmolm⁻²s⁻¹; a su vez otras 20 hojas provenientes también de rosetas obtenidas a partir de propagación vegetativa, con un largo de 5 mm (CHICAS), se mantuvieron en cajas con sustrato de las mismas características que las hojas medianas y con la misma capacidad de campo, 24.8±0.6 °C (Mínima) ~ 29.1±0.07 °C (Máxima) de temperatura y una intensidad lumínica de 1.15 μmolm⁻²s⁻¹. Se utilizó intensidades muy bajas para evitar un daño por deshidratación y verificar si hay una respuesta positiva en estas intensidades luminosas.

Estos experimentos tuvieron una duración de 2 meses y al concluir este tiempo se realizaron los conteos de raíces y brotes desarrollados.

NOTA: Sustrato = 316 gr de tierra de hoja con tepojal 1:1 (tamizado por una malla de 0.5cm).*

Experimento 7. Proporción del desarrollo de raíces, rosetas, brotes con raíz y callo en esquejes de hoja.

Se realizó un experimento más con siete cajas (10 hojas por caja), para obtener la proporción de raíces, rosetas, brotes con raíz y callo (Fig. 20), que los esquejes de hoja de *E. laui* formaron después de mantenerlos dos meses en las mismas condiciones que “N” en el experimento 5.

Los conteos se realizaron al concluir el tiempo señalado.



PROPAGACIÓN SEXUAL

Plantas cultivadas en el vivero “La Iberia”, fueron trasladadas al invernadero de la unidad de “Morfología y Función de la FES-Iztacala, UNAM”, ahí desarrollaron escapos florales y se obtuvieron 1406 semillas de *Echeveria laui*.

Con el fin de determinar la viabilidad de las semillas a través del tiempo y su sensibilidad ante cambios de temperatura. Se colocaron en cajas Petri 20 semillas (por caja), con 5 hojas de papel secante en su interior, humedecido con 5 ml de agua destilada; en todos los casos el porcentaje total de germinación se obtuvo a los 75 días después de su siembra en cajas Petri, el almacenamiento de las semillas, se realizó en un tubo de 1.5 ml cerrado herméticamente y se mantuvieron en una temperatura de 25.3~32.8 °C y HR de 25.7~35.7 %, es importante mencionar que el criterio de selección de semillas para realizar las pruebas de germinación fue:

Un aspecto robusto, color rojizo y ornamentado.

Los datos se normalizaron con “ARCOSENO”.

Las pruebas de germinación se realizaron como se indica en el Cuadro 3:

Cuadro 3.- Indica las características de cómo se desarrollaron las pruebas de germinación.

PRUEBA DE GERMINACIÓN	DÍAS	TEMPERATURA	INTENSIDAD	FOTOPERIODO Luz/Oscuridad
1	0	20~34 °C	20 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs
2	30	8.75~28.75 °C	0.81~265 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs
3	166	23 °C	18.56 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs
4	166	23 °C	-	0/24 Hrs
5	166	14 °C	28 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs
6	166	14 °C	-	0/24 Hrs
7	203	8.75~28.75 °C	0.81~265 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs
8	280	23 °C	18.56 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs



PROPAGACIÓN POR CULTIVO *in vitro*

Para realizar el lavado en los diferentes tejidos de *E. laui* se consideró lo siguiente:

- ✓ Hojas del ápice de la planta adulta= Se lavó la planta con tallo, por lo menos 6 hojas apicales y sin raíces.
- ✓ Hojas turgentes de la parte basal= Se desprendieron las hojas de la planta adulta sin seccionarlas.
- ✓ Hojas de rosetas provenientes de propagación vegetativa por esqueje (brotes de 2.10 cm en promedio)= Se realizó el lavado de las rosetas completas sin desprender las hojas.
- ✓ Tallos= Se lavó con 6 hojas apicales y sin raíces.

El lavado de los tejidos se realizó de la siguiente forma:

- ♣ Se lavaron por cinco minutos con una solución jabonosa y agua destilada.
- ♣ Se enjuagaron para retirar el exceso de jabón.
- ♣ Posteriormente, se sumergieron en etanol al 80% durante un minuto y medio.

A partir de ese momento el procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas.

- ♣ Se sumergieron en hipoclorito de sodio al 25% (a partir de cloro comercial) con dos gotas de tween 20 durante 25 minutos.
- ♣ Se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril (2min por enjuague) para eliminar el hipoclorito de sodio.
- ♣ Se procedió a su siembra en los diferentes medios de cultivo.

Todos los explantes después de sembrarlos en los diferentes medios de cultivo se mantuvieron en una temperatura de 23 °C, con un fotoperiodo de 16:8 luz/obscuridad y una intensidad luminosa de $24.1 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A los diferentes tejidos sembrados se les realizaron de uno a dos cortes transversales según el tamaño; las hojas de la parte basal y apical, se sembraron con el envés sobre el medio, las rosetas provenientes de esqueje se deshojaron para colocar de forma individual las hojas de la misma forma que las anteriores y en el caso del tallo se sembró con la parte basal enterrada en el medio en forma de estaca.



Se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962, Anexo 3), suplementado con diferentes compuestos orgánicos y hormonas para estandarizar el desarrollo de callo y la formación de brote en *Echeveria laui*.

A continuación, en el cuadro 4 se indican las concentraciones y especificaciones necesarias para preparar los medios utilizados en este trabajo:

Cuadro 4.- Medios de cultivo utilizados para la propagación *in vitro* y material de *E. laui* para la siembra.

NOMBRE DEL MEDIO	CONTENIDO DEL MEDIO	ORIGEN DEL EXPLANTE
VRc	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l BAP + 30gr/l Sacarosa + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas turgentes de la parte basal, hojas del ápice, hojas de roseta propagada por esqueje y tallos
VRr	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 4mg/l ANA + 30gr/l Sacarosa + 100mg/l Carbón activado + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas de roseta propagada por esqueje y callos inducidos <i>in vitro</i>
VRb1	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 6mg/l BAP + 30gr/l Sacarosa + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas de roseta propagada por esqueje
VRb2	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 4mg/l BAP + 30gr/l Sacarosa + 100mg/l Carbón activado + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas de roseta propagada por esqueje y callos inducidos <i>in vitro</i>
VRb3	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 6mg/l Kinetina + 30gr/l Sacarosa + 100mg/l Carbón activado + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas de roseta propagada por esqueje
VRb4	MS + 0.5mg/l Tiamina + 100mg/l Mioinositol + 6mg/l Kinetina + 4mg/l ANA + 30gr/l Sacarosa + 100mg/l Carbón activado + 7gr/l Agar. pH=5.7-5.9	Hojas de roseta propagada por esqueje y callos inducidos <i>in vitro</i>
C-5 (Wojciechowicz <i>et al.</i> , 2001)	MS + 4mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D + 7gr/l Agar. No menciona ajuste de pH , éste quedo en 6.34-6.4	Hojas de roseta propagada por esqueje y callos inducidos <i>in vitro</i>
Medio K-12 (Wojciechowicz <i>et al.</i> , 2001) modificado	$\frac{1}{4}$ Macro + 6mg/l BAP + 7gr/l Agar. El autor utilizó Zeatina como citocinina, sin embargo no se contó con esta hormona y se reemplazó por BAP. No menciona ajuste de pH , éste quedo en 6.14	Hojas de roseta propagada por esqueje



MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

También se tomaron fotografías con microscopía electrónica de barrido, de los diferentes tejidos resultantes de Propagación *in vitro* y de semillas de *E. laui* (aunque estas últimas no necesitaron del procedimiento presentado en el cuadro 5).

Esta técnica se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Rejero (2009), como lo indica el Cuadro 5:

Cuadro 5.- Indica paso a paso el método utilizado, para fijar y deshidratar los tejidos vegetales, antes de colocarlos en el microscopio electrónico de barrido.

PASOS	SOLUCIONES	TIEMPO
1	Glutaraldehído 2.5 %	2 H
2	El tejido se enjuaga con solución reguladora (Fosfatos 0.1 M), pH 7 marca J. T. Baker.	3 veces (10 min cada lavado)
3	Etanol 10 %	10 min
4	Etanol 20 %	10 min
5	Etanol 30 %	10 min
6	Etanol 40 %	10 min
7	Etanol 50 %	10 min
8	Etanol 60 %	10 min
9	Etanol 70 %	10 min
10	Etanol 80 %	10 min
11	Etanol 90 %	10 min
12	Etanol 100 %	30 min
13	Etanol 100 %	30 min
14	Etanol 100 %	30 min
15	Hexametildisilazano (HMDS)	Mínimo 6 H
16	Cubrir con oro	1 min (100-200 Å)

Las fotografías se realizaron en el microscopio (JEOL JSM-638 OLV) de la “Unidad de Biotecnología y Prototipos” (UBIPRO), FES-I, UNAM, con ayuda del programa JEOL Scanning Electron Microscope.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROPAGACIÓN VEGETATIVA POR ESQUEJE DE HOJA

Se visualizó la dificultad que tenía, el desprendimiento de hojas, a partir de plantas de *Echeveria laui*, en éstas, la disposición de las hojas se presentó de forma helicoidal (Tejero, *et al.*, 1998) y a través del tiempo formó una base de hojas secas que presionaron las hojas viables de forma que se volvió difícil su desprendimiento. Al desplantar la roseta de *E. laui*, se retiraron todas las hojas marchitas y secas que se acumularon formando una especie de “colchón” durante el crecimiento de la misma (Fig. 2). También se tomó la hoja de la parte más cercana al tallo, procurando que al desprenderla, se mantuviera en buen estado la base de la hoja, la cual formó una especie de media luna (Fig. 3), ya que cuando ésta resultó dañada, la formación de brote se afectó. Es recomendable hacer el menor daño posible al cuerpo de la hoja, ya que entre mayor daño tenga la hoja, el tiempo de vida es menor.

A diferencia de lo que menciona Piña-Poujol, *et al.* (2007), donde refieren, que la propagación vegetativa se da de manera natural, a partir de la caída de las hojas. Nuestra experiencia en el manejo de la especie, nos indica que la reproducción en campo, no se realiza por medios vegetativos si no sexuales, aun que como lo indican Piña-Poujol, *et al.* (2007), el evento es “raro” y es necesario investigar mas a fondo para evitar su extinción.

Piña-Poujol, *et al.* (2007), mencionan, que la propagación vegetativa por esqueje de hoja, es un método destructivo, sin embargo, se demostró que este método no es del todo destructivo para los individuos, debido a que es innecesario e inútil desprender todas las hojas de la planta adulta, ya que las hojas cercanas al ápice (que no formaron la media luna en el punto de unión con el tallo) tuvieron una respuesta menos acelerada a la formación de brotes, que las que si la presentaron (Fig. 7). También se observó que las plantas deshojadas, lograron recuperarse en 3 meses (Fig. 40).



Experimento 1. Efecto de luz, humedad, reguladores de crecimiento y su aplicación, en la formación de brotes por esqueje de hoja.

Se utilizó AIB como regulador de crecimiento, porque es un regulador que en general, se caracteriza por inducir un sistema de raíces fuertes y fibrosas (Weaver, 1990), sin embargo no hubo un efecto del regulador sobre la inducción de raíz, ya que en ninguno de los casos se presentó.

Cuadro 6. Tratamientos del Experimento1, esquejes de hoja de *E. laui* en dos intensidades de luz, dos condiciones de humedad, tres tratamientos con AIB aplicados con tres vehículos diferentes y dos testigos.

	+LUZ 1.795~760 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$		-LUZ 0.81~265 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	%BROTOS	%SOBREVIVENCIA	%BROTOS	%SOBREVIVENCIA
TALCO+AIB 500ppm, H , 41.21 % CC	50	100	50	100
TALCO+AIB 500ppm, S , 1.95 % CC	50	100	100	100
VASELINA+AIB 500ppm, H , 41.21 % CC	0	0	0	75
VASELINA+AIB 500ppm, S , 1.95 % CC	0	0	0	50
ETANOL 96%+AIB 200ppm, H , 41.21 % CC	0	100	25	75
ETANOL 96%+AIB 200ppm, S , 1.95 % CC	25	75	50	100
TESTIGO CON CERA, H , 41.21 % CC	0	0	25	50
TESTIGO CON CERA, S , 1.95 % CC	25	75	50	100
TESTIGO SIN CERA, H , 41.21 % CC	0	100	0	100
TESTIGO SIN CERA, S , 1.95 % CC	25	75	50	100



El tratamiento con VASELINA, tiene un efecto negativo en la sobrevivencia del esqueje (Cuadro 6), ya que evitó la evapotranspiración del esqueje y sus funciones naturales (provocando una acumulación de agua en el mesófilo y el alargamiento de las células epidérmicas), contrario a lo que menciona Waever (1990), en donde explicó que la vaselina es un portador inerte con buenos resultados.

Los tratamientos de TALCO, presentaron los porcentajes más altos, en el desarrollo de brotes (H, +LUZ 50 %, H, -LUZ 50 %, S, +LUZ 50% y S, - LUZ 100%), sin embargo, no se debió al efecto del regulador, ya que según Hartmann y Kester (1988), el AIB es efectivo para estimular la formación de raíces, debido a su amplia gama de concentraciones que estimulan el enraizamiento en un gran número de especies. Para inducir brotes, las hormonas son a menudo más eficientes cuando se utilizan en combinación y no de forma individual (Weaver, 1990). Así que el efecto positivo, se le atribuyó a la forma en que se aplicó la hormona (Fig. 8), ya que el talco funciona como un agente aislante, disminuyendo la temperatura y la intensidad luminosa, tal y como lo haría una planta nodriza (Franco y Nobel, 1989) o la cera natural que posee la planta, induciendo así la formación de roseta en esquejes de *E. laui*.

Es importante señalar que las respuestas de los esquejes en los grupos “S” (1.95 % CC, Cuadro 6) mostraron lo que podría ser una tendencia positiva, tanto en la formación de brotes, como en su sobrevivencia, esto nos indicó que existe una real adaptación de las hojas a sobrevivir en ambientes secos, pero con baja intensidad de luz, como se encontraría un esqueje bajo una planta nodriza, en su ambiente natural. Aunque ésta adaptación existe, es importante retomar lo dicho anteriormente, existe una dificultad para el desprendimiento de hojas y sería muy raro que de forma natural, *E. laui* perdiera sus hojas y se diera pie a la propagación por esqueje de hoja.

Al comparar solo las dos intensidades de luz utilizadas, reflejaron que una intensidad luminosa arriba de $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, representa un riesgo para la obtención de brotes por esqueje, disminuyendo a la mitad el número total de brotes obtenidos (Cuadro 6), lo cual sustenta las observaciones de Piña Poujol *et al.* (2007), quienes mencionan que hay una tendencia favorable en intensidades de luz de $88.74 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.



También se observó un enrojecimiento a lo largo de toda la hoja, en esquejes colocados en +LUZ, debido quizá, a la síntesis de antocianinas como respuesta del estrés de temperatura e intensidad de luz (Laleh, *et al.*, 2006), que podría perjudicar el desarrollo de brote.

El total de hojas colocadas en “-LUZ” alcanzaron un 35 % en la formación de rosetas y se mantuvieron más turgentes que las colocadas en “+LUZ” (17.5 %), la tonalidad roja, sólo se presentó en la parte basal de la hoja en “-LUZ” (Gráfica 2, Fig. 9), Los brotes que se formaron al exponer los esquejes de *E. laui* a intensidades arriba de $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, desarrollaron brotes con un tamaño promedio máximo de 6.9 mm y un mínimo de 1.9 mm en su diámetro más largo, a diferencia de los esquejes que se mantuvieron en “-LUZ”, los cuales tuvieron un tamaño máximo promedio de 9.2 mm y un mínimo de 2.2 mm en su diámetro más largo en un tiempo de dos meses (Fig. 10); al cabo del tercer mes solo se tomaron lecturas de los tamaños de brotes y se observó que los brotes más grandes de ambas intensidades, tuvieron un tamaño que rebasa los 2 cm y los más chicos alcanzaron un tamaño arriba de 1 cm, en su diámetro más largo (Fig. 11), esto no concuerda con lo reportado por Piña-Poujol *et al.* (2007), que al cabo de 287 días obtuvieron tamaños promedio de 1.29cm a 1.79cm, En este trabajo el promedio después de 90 días fue de 1.48cm a 1.6cm en su diámetro mas largo, llegando hasta rosetas de más de 4cm en su diámetro más largo (Fig. 12), lo que significa que se obtuvieron casi los mismos tamaños de rosetas en un tercio del tiempo invertido por Piña-Poujol *et al.* (2007).

Otra diferencia interesante fue la respuesta que tuvieron los brotes, al someterlos a obscuridad después del tercer mes, ya que a los 4 días de mantenerlos así, sólo los brotes provenientes de “+LUZ” desarrollaron raíz (Fig. 13), como lo mencionan Piña Poujol *et al.* (2007), condiciones de sombra favorecen en mayor proporción el surgimiento de raíces. Sin embargo, después de un total de 18 días los brotes de “-LUZ” no formaron raíz.

Los datos relacionados con la humedad, reflejaron que los esquejes colocados en un sustrato húmedo, tuvieron un menor porcentaje en la formación de brote, a diferencia de los que se mantuvieron en un sustrato seco, lo cual no coincide con Piña Poujol, *et al.* (2007), ya que ellos obtuvieron una tendencia a la formación de roseta en un sustrato humedecido con nutrientes.



El bajo porcentaje en la formación de rosetas de *E. laui* (Gráfica 3), se explicaría porque un sustrato húmedo (H) retiene más calor y el exceso de calor puede impedir la reproducción de los individuos en ciertos microambientes (Cervantes *et al.*, 2005).

Experimento 2. Efecto de los reguladores de crecimiento y su aplicación, sobre la inducción de brote, raíz o ambas.

Las respuestas de los esquejes para el desarrollo de brote, raíz y brote con raíz, fueron muy bajas (Cuadro 7), esto se le atribuyó a la forma en como se aplicó la hormona ya que Rivero (2005), menciona que 5 segundos son suficientes para obtener raíces en concentraciones de 1000mg/l de AIB en estacas de *Myrciaria jaboticaba* (una planta leñosa) y en este trabajo se utilizaron 500 y 250mg/l de AIB sumergidas durante 60 minutos, después de haber sido sumergidos los esquejes, tomaron una coloración rojiza en toda su superficie, las hojas perdieron turgencia y adquirieron una consistencia “flácida” (Fig. 14).

Aunque se obtuvo un número muy reducido en la formación de brote, éste no redujo la sobrevivencia de la hoja ya que se obtuvo un valor promedio muy alto (91.67 %).

En lo que respecta a los tratamientos, existe una tendencia a la formación de raíz, ya que las respuestas de los esquejes se inclinan hacia este desarrollo (8.33 % promedio de todos los tratamientos que formaron raíz).

Los datos muestran que “AIB 500 ppm HE” y “AIB 1000 ppm HE”, tienen un efecto sobre la inducción de raíz, ya que son los únicos que tienen valores superiores, al del resto de los tratamientos (37.5 y 25 % respectivamente), esta respuesta se puede deber a la unión de dos factores: La eficiencia del AIB, que es efectivo para estimular la formación de raíces (Hartmann y Kester, 1988) y las condiciones en sombra que favorecen el surgimiento de raíces (Piña Poujol *et al.*, 2007), es posible que el porcentaje de enraizamiento de estos tratamientos se eleven, si se reduce el tiempo de exposición a la solución, ya que como se mencionó anteriormente, la disminución en la respuesta de los esquejes, se dio, por la sobreexposición del material en las soluciones.



Cuadro 7.- Porcentajes de los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos del experimento 2, donde “S” se refiere a esquejes sobre un sustrato seco (1.95 % CC), “H” esquejes sobre un sustrato húmedo (41.21 % CC) y “HE” a esquejes enterrados en un sustrato húmedo (41.21 % CC).

TRATAMIENTOS	%RAIZ	%BROTE	%BROTE Y RAIZ	%SOBREVIVENCIA
<i>TESTIGO SIN CERA S</i>	12.5	-	-	87.5
<i>TESTIGO CON CERA S</i>	-	-	-	100
<i>AIB 500PPM S</i>	12.5	12.5	-	100
<i>AIB 1000PPM S</i>	-	-	-	100
<i>BAP 500PPM S</i>	12.5	-	12.5	100
<i>BAP 1000PPM S</i>	-	-	-	87.5
<i>TESTIGO SIN CERA H</i>	-	-	-	62.5
<i>TESTIGO CON CERA H</i>	12.5	-	-	100
<i>AIB 500PPM H</i>	12.5	-	-	100
<i>AIB 1000PPM H</i>	12.5	25	-	100
<i>BAP 500PPM H</i>	-	12.5	-	100
<i>BAP 1000PPM H</i>	-	-	-	87.5
<i>TESTIGO SIN CERA HE</i>	-	-	-	75
<i>TESTIGO CON CERA HE</i>	12.5	-	-	87.7
<i>AIB 500PPM HE</i>	37.5	-	-	62.5
<i>AIB 1000PPM HE</i>	25	-	-	100
<i>BAP 500PPM HE</i>	-	-	-	100
<i>BAP 1000PPM HE</i>	-	-	-	100

Experimento 3. Determinación de la influencia de la obscuridad, en la inducción de raíz.

Los resultados mostraron que una temperatura fluctuante y sin luz (“OI”, 9-29 °C/obscuridad), favorecía el desarrollo de raíces hasta un 30 % (Cuadro 8), sin embargo, el tratamiento denominado “LA” que se mantuvo con una intensidad luminosa de 21~23°C/30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, desarrolló brotes con presencia de raíz en un 36.36% (Gráfica 4), es por esto que dentro de éste experimento, la obscuridad no fue tomada como el factor determinante para la formación de raíz, no obstante, hubo una inclinación a formarla en intensidades bajas (“LA” 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Esta respuesta reafirma los resultados del experimento 1, en donde se mencionó, que las hojas tienen una adaptación a medios secos y de bajas intensidades de luz, también concuerda con Piña Poujol



et al. (2007), quienes mencionan que las condiciones de sombra, favorecieron el surgimiento de raíces.

Las raíces obtenidas de “OI” (9~29°C/Obscuridad) tuvieron una coloración rojiza y aunque es una raíz pequeña que alcanza un tamaño de 2.74 mm, se mantuvo viva, a diferencia de las raíces con brote obtenidas en el tratamiento “OA” (21~23°C/Obscuridad), que fue una raíz incolora, muy pequeña (1.51 mm) y que se necrosó al paso del tiempo, al igual que el brote (Fig. 15).

Si esto ocurriera en el campo, se podría pensar que las poblaciones de *E. laui*, tienen poca variabilidad y daría una posible respuesta, del por que esta en peligro de extinción, sin embargo, como antes se mencionó, si la reproducción sexual, Piña-Poujol *et al.* (2007), la reportan como un evento “raro”, el desprendimiento de hojas, por sus características, sería un evento aún mas “raro”.

La respuesta en la formación de raíz, parecía ser uno de los principales factores que desencadenarían el desarrollo de una roseta, debido a que el esqueje tendría la capacidad de obtener los nutrientes necesarios para formar hojas, como lo mencionan Piña-Poujol *et al.* (2007), las hojas que quedan en contacto con el suelo, pueden producir raíces adventicias y nuevas hojas, generando rosetas completas y los esquejes contienen un reservorio energético considerablemente mayor al de las semillas, sin embargo, en este trabajo se encontró que el desarrollo de raíz, no garantizaba la formación de rosetas, ni la roseta favorecía la formación de raíz, ya que en el caso de “OI” (9~29°C/Obscuridad) durante los dos meses que se mantuvieron los esquejes en obscuridad, nunca desarrollaron rosetas, y en “LA” (21~23°C/ $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), se observó que no era la raíz quien promovía el brote, ya que los esquejes desarrollaban primero la roseta y luego en ocasiones la raíz (Fig. 16). También se encontraron diferencias de tamaños en brotes, dentro de los tratamientos como lo muestra la figura 17.



Cuadro 8.- Porcentajes de raíz, brote y brote con raíz, obtenidos después de dos meses de haberse mantenido en las diferentes condiciones de luz y temperatura.

	RAÍZ	BROTE	BROTE C/RAÍZ
9~29°C/Obscuridad (OI)	30%	0%	0%
9~29°C/0.81~265 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LI)	9.09%	9.09%	18.18%
21~23°C/Obscuridad (OA)	0%	10%	20%
21~23°C/30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LA)	9.09%	9.09%	36.36%

Experimento 4. Influencia de la temperatura y de las intensidades luminosas sobre la formación de brote.

Solo se obtuvo la formación de raíz en dos esquejes, uno de la caja que denominamos “MEDIO” (90.69 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 23~38 °C) y otro en “BAJO” con una intensidad luminosa de 21.53 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 23 a 32 °C de temperatura (Fig. 18).

Todos los esquejes de “ALTO” (373.38 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 23~49 °C) necrosaron (Fig. 19 y 21), sin embargo las hojas que estuvieron en “MEDIO” y “BAJO” se mantuvieron con vida (aunque sin una buena apariencia), ya que se observó una pérdida de turgencia.

En la parte basal de las hojas, se formó lo que Joel Pérez Crisanto llama “callo” (comunicación personal), (Fig. 20).

También se confirmó que la tonalidad roja de los esquejes de hoja, se debió a un estrés por la intensidad de luz, ya que las hojas que se mantuvieron en OBSCURIDAD (tratamientos de “TEMPERATURA ALTA 34~35 °C y BAJA 14 °C”), no presentaron dicha, se pudo observar que entre más intensidad de luz incidió en el esqueje, mayor fue la tonalidad roja del mismo, sin embargo las temperaturas bajas junto con luminosidad, también generan un estrés que se manifiesta con dicha coloración, ya que las hojas que se mantuvieron en “FRIO” (28 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 14 °C), presentaron a los 7 días una tonalidad rojiza y en ninguno de los casos se obtuvieron brotes (Fig. 22).



Experimento 5. Influencia del sustrato y la humedad relativa, en la inducción de brote.

Los tratamientos que obtuvieron los porcentajes más alto en la formación de brote, fueron “N” (caja sin sustrato, oscilación de HR 19.4 %) con un 60 % y “S” (caja con sustrato a 1.95 % CC, HR oscilación de 5.8 %) con un 50 % (Gráfica 5), reafirmando nuevamente los resultados obtenidos en el experimento 1 y 3, donde las hojas mostraron una adaptación a medios secos y con bajas intensidades de luz.

Cuadro 9.- Porcentajes de respuesta de los esquejes de *E. laui* sometidos a intervalos de Humedad Relativa con su oscilación y rangos de temperatura con su oscilación, en los diferentes sustratos en que se mantuvieron los esquejes durante dos meses.

SUSTRATOS	BROTE %	RAÍZ %	S/RESPUESTA %	HR %	OSCILACIÓN HR %	TEMPERATURA °C	OSCILACIÓN °C
N	60	20	20	28.1-47.4	19.4	23.5-32	9.5
F	30	30	40	29-87	59	24.2-29.4	5.3
S	50	10	40	30.5-36.2	5.8	24.3-32.9	7.8
H	40	0	60	78.4-92.5	14.2	21.8-30.1	8.4

En este experimento no se encontró ninguna relación de los sustratos, con la formación de brote, pero si la hubo con la humedad relativa, ya que como lo muestra el cuadro 9, una HR que se encontró entre 28.1~47.4%, presentó una respuesta favorable en el desarrollo de brotes, sin embargo una HR arriba de 47.4% afectó drásticamente la cantidad de brotes que se obtuvieron (F= 30 % brotes, H= 40 % brotes).

Todos los brotes desarrollaron raíz y ésta al igual que la formada en esquejes sin roseta, fue muy alargada y delgada (Fig. 23), Piña Poujol *et al.* (2007), mencionan que las condiciones de sombra, favorecieron en mayor proporción el surgimiento de raíces, lo cual confirma los resultados de este trabajo, ya que en este experimento utilizamos una intensidad luminosa baja ($38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).



Experimento 6. Influencia de la luz en el desarrollo de brote o raíz en hojas pequeñas, utilizadas como esqueje.

Se observó una respuesta muy rápida por parte de las hojas denominadas “MEDIANAS” (2.5 cm, $1.8 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), ya que a los 21 días éstas desarrollaron raíz con excepción de 3 esquejes que habían muerto (Fig. 24), contrario a las hojas “CHICAS” (5 mm, $1.15 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), en las cuales se observó que necesitaban una intensidad de luz mayor y no hubo respuesta de parte de ellas, debido a que murieron todas (Fig. 25).

Las hojas “MEDIANAS” aunque desarrollaron raíz, solo sobrevivieron 14 y no desarrollaron brotes en los de 60 días que se mantuvo el experimento.

La raíz no garantizó la sobrevivencia de los esquejes, ya que después de 10 meses solo sobrevivieron 8 esquejes con brote y 2 con raíz (Fig. 26), cabe mencionar que al mes de haber terminado el experimento, se les cambió a una intensidad luminosa promedio de $38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, esperando que al aumentar la intensidad, se induciría la formación de brote y así fue, mientras se mantuvo en intensidad de $1.8 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, las hojas solo aumentaron de grosor debido a la captación de agua en un ambiente húmedo (HR= 84.6~93.4 %), al cambiarlas a una intensidad de $38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, los brotes se desarrollaron después de 15 días, esta respuesta ya se había observado en experimentos anteriores, un ambiente húmedo prolongó el tiempo en el desarrollo del brote y uno con menor humedad favoreció el tiempo de respuesta.

Experimento 7. Proporción del desarrollo de raíces, rosetas, brotes con raíz y callo en esquejes de hoja.

Los resultados mostraron que los esquejes en “N” (caja de plástico con tapa transparente, sin sustrato, intensidad luminosa promedio de $38.66 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, HR 28.1~47.4 %, Temperatura de 23.5~31.1 °C) desarrollaron rosetas con raíz (BCR) en un 50% (± 8.72) y 20% (± 7.86) brotes sin raíz (BROTE), al igual que el desarrollo de raíz (R= 20 % ± 9.25). Ver cuadro 9.



Para los esquejes que obtuvieron solo la formación de callo (C) se determinó un porcentaje del 10% (± 4.36), sin embargo no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) los porcentajes de “BROTE, BCR, R y C” (Gráfica 6).

Cuadro 9.- Proporción de Rosetas (BROTOS), Rosetas con raíz (BCR), Raíz (R) y Callo (C) obtenidos de esquejes de *E. laui*, colocados en las mismas condiciones que el tratamiento “N” (del experimento 5) durante 60 días.

“N”			
BROTOS	BCR	R	C
20%	50%	20%	10%

Una vez concluido el experimento, se observó que los esquejes pudieron generar hasta tres brotes por hoja en un lapso de 90 días, también se notó que esta regeneración se dio a una velocidad mayor a partir de haber retirado el primer brote (a los 60 días), dando pie al segundo brote que se desarrolló en aproximadamente 30 días más, en algunos casos se desarrolló una tercer roseta pero generalmente no sobrevivió, debido a la alta deshidratación que sufrió la hoja, sin embargo no se realizó la recopilación de datos, ni el análisis pertinente y sería importante analizar estos hechos.



PROPAGACIÓN SEXUAL

Pruebas de Germinación

Después de 10 días, las semillas de la prueba de germinación 3 (23 °C, 18.56 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) mostraron que la germinación se dio en un 24.5 % y se estabilizó después del día 45 con un 57 % (Gráfica 9), manteniéndose sin cambios hasta el día 75.

La germinación de semillas de *E. laui* colocadas en obscuridad, concuerda con los datos de Piña-Poujol *et al.* (2007), en donde mencionan que las semillas son fotoblásticas estrictas, debido a que en ninguno de los casos las semillas germinaron en obscuridad (pruebas 4 y 6, ver cuadro 10).

En la prueba de germinación 1 (20~34 °C, 20 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), después de 47 días las semillas de *E. laui* germinaron hasta un 12 % (Cuadro 10) y se mantuvieron sin cambios 28 días más, que fue el tiempo que se estableció para terminar la prueba de viabilidad (Gráfica 7), el bajo porcentaje de germinación pudo deberse a dos factores:

- 1.- Que las semillas requirieran un tiempo de maduración para mejorar su viabilidad.
- 2.- La variación en la temperatura hubiera afectado el porcentaje de germinación.

Al evaluar estadísticamente ($\alpha=0.025$), la opción número dos pareció ser la respuesta indicada, ya que se obtuvo un efecto negativo relacionado con la fluctuación de la temperatura (Gráfica 8), como lo mencionan Piña-Poujol *et al.* (2007), en donde encontraron un efecto significativo en el porcentaje final de germinación.

Sin embargo, al comparar el promedio final de germinación (75 días) en los distintos tiempos que se germinaron las semillas (pruebas 1, 3 y 8), los resultados muestran una tendencia positiva (Gráfica 10), en donde se puede observar un incremento en el número de semillas germinadas (12% el día 0, 57% el día 166 y 82% el día 280), mostrando así que es importante dar un tiempo de maduración para obtener el mayor número de individuos posibles.

En el caso de las pruebas de germinación 2 y 7 (8.75~28.75 °C, 0.81~265 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), no mostraron ninguna respuesta de su viabilidad (Cuadro 10), durante los 75 días que duraron las pruebas, esto debido a la fluctuación de temperatura, lo cual concuerda con los datos reportados



por Piña-Poujol *et al.* (2007), en donde refieren que no obtuvieron germinación en una cámara con temperatura fluctuante (18~32 °C) y una luminosidad de $10.88 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, (la intensidad luminosa utilizada en la prueba uno de $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, podría explicar que hubiera germinación.), en comparación a las semillas que se colocaron en temperaturas constantes (25 °C y 18 °C). Una respuesta similar se obtuvo con las semillas que se mantuvieron en condiciones controladas, con una temperatura de 23 °C y $18.56 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, ya que fueron las que mayor porcentaje de germinación presentaron (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Indica las características de cómo se desarrollaron las pruebas de germinación y los porcentajes de germinación a los 75 días.

PRUEBA DE GERMINACIÓN	DÍAS	TEMPERATURA	INTENSIDAD	FOTOPERIODO Luz/Oscuridad	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN
1	0	20~34 °C	$20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	12 % (± 4.22)
2	30	8.75~28.75 °C	$0.81\sim 265 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	-
3	166	23 °C	$18.56 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	57 % (± 10.78)
4	166	23 °C	-	0/24 Hrs	-
5	166	14 °C	$28 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	-
6	166	14 °C	-	0/24 Hrs	-
7	203	8.75~28.75 °C	$0.81\sim 265 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	-
8	280	23 °C	$18.56 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	16/8 Hrs	82 % (± 4.54)

La prueba que se realizó a una temperatura de 14 °C (prueba 5), no estimuló la germinación en ninguna de las 10 cajas colocadas, esto también podría estar relacionado con la sensibilidad que presentan las semillas de *E. laui* ante el cambio de temperatura, como lo menciona Piña-Poujol *et al.* (2007), donde analizaron la respuesta de semillas con diferentes orígenes (invernadero y campo), observaron que en una temperatura de 25 °C, las semillas tenían una germinación similar, pero al colocar otras semillas con las mismas características anteriores, en una temperatura más baja (18 °C), éstas presentaban germinaciones totalmente diferentes e incluso menores a las mantenidas a 25 °C, ellos atribuyen este fenómeno al llamado “Efecto Materno”, el



cual explica, que las semillas presentan una afinidad mayor a las temperaturas que fue expuesta la planta madre. Si consideramos las afirmaciones de Piña-Poujol *et al.* (2007), explicaría el por que las semillas que se colocaron a 14 °C, no germinaron, sin embargo, las semillas para este trabajo fueron obtenidas de plantas que se mantuvieron en el vivero “La iberia”, en Cuicatlán, Oaxaca, durante su crecimiento (esto fue un tiempo aproximado de dos años), luego se trasladaron al Estado de México, para mantenerlas en el invernadero del laboratorio de la “Unidad de morfología y función”, de la FES Iztacala, durante 2 meses mas, que fue el tiempo en el que florecieron las plantas y ya sea que las semillas tuvieran una afinidad con las temperaturas de Oaxaca ó del Estado de México, la teoría del “*Efecto Materno*” no explicó porque las semillas, tuvieron una tendencia a germinar en ambientes artificiales o controlados en su temperatura y no así, en ambientes naturales o semicontrolados, como lo fue un invernadero en donde las temperaturas fueron fluctuantes y seria similar al sitio en donde las plantas madre se desarrollaron.



PROPAGACIÓN POR CULTIVO *in vitro*

El tallo de *E. laui* sembrado en los diferentes medios, se obscureció rápidamente y murió, lo mismo sucedió con hojas provenientes de la parte basal de la planta adulta, aunque a menor velocidad, dándole tiempo al tejido de responder, el problema con estas hojas estuvo en el lavado, ya que es un material muy grande y turgente, con poca flexibilidad y al final del proceso resulta dañado, esto también lo refieren Wojciechowicz *et al.*(2001), quienes no utilizaron las hojas de la parte basal de *E. laui*, por que se dañaron durante el proceso de lavado. Además por la disposición en forma de roseta, acumuló impurezas, haciendo difícil su lavado, esto nos llevó a la necesidad de utilizar más material para amortiguar las pérdidas por contaminación con hongos. Sin embargo, hubo una parte de la planta adulta que resultó interesante utilizar, el ápice.

Al utilizar una planta completa, se notó que en la parte apical se encontraban una serie de pequeñas hojas de aproximadamente 1mm, que a simple vista no pueden ser observadas, ya que hay que retirar todas las hojas para poder verlas y se encuentran exactamente en la parte central de la planta, éstas hojas aún al ser muy frágiles, lograron resistir el agresivo lavado sin resultar dañadas, ya que la disposición de las hojas mas grandes las protegieron y resultaron un material de propagación muy bueno por no mostrar obscurecimiento en el tejido, ni problemas de contaminación por hongos.

Otro material vegetal utilizado, fue el que provenía de propagación por esqueje, este material podría ser el más indicado, al no recurrir a sacrificar plantas adultas, como en el caso anterior. No presentó problemas por espacio en el lavado ya que fueron rosetas de un promedio de 2.10 cm, con alrededor de 10 hojas, el daño ocasionado por el lavado a las hojas, disminuyó al poder mantenerlas en roseta mientras se hacia ese procedimiento, ya que la disposición de las hojas que se encuentran mas expuestas, protegían a las menos expuestas y la contaminación se redujo al inducir las rosetas en un ambiente mas limpio, colocando los esquejes en condiciones artificiales; Wojciechowicz, *et al.*, (2001), en su artículo menciona que las hojas jóvenes de *E. laui*, regeneraron mejor que las “viejas”, lo que confirmó que este material fue el mas indicado para utilizarlo en cultivos *in vitro*.



Cuadro 11.- Respuestas de los diferentes tejidos (A= hojas en crecimiento de la parte apical, HB= hojas de la base de planta adulta, HE= hojas de rosetas provenientes de esqueje, T= tallos, C= callos *in vitro*) colocados en los medios que se realizaron en este trabajo (✓= con resultados, ~ = sin resultados).

MEDIO	RESPUESTA	TIPO DE EXPLANTE	CALLO	RAÍZ	BROTE
VRc (Fig. 36)	HB= superhidratación de la hoja, ruptura de la epidermis, exposición del mesófilo y necrosis del tejido. A= rompimiento de epidermis, división celular y después de 20 días formación de callo friable de color verde y amarillo. HE= rompimiento de epidermis, división celular en la periferia de la hoja y después de 50 días formación de callo friable de color verde. T= necrosis después de 3 días.	HB, A, HE, T	✓	~	~
VRr	HE= división celular solo en el punto de corte y formación de callo lenta. C= mantenimiento de la viabilidad del callo, sin crecimiento.	HE, C	✓	~	~
VRb1	HE= mantenimiento de la viabilidad del tejido, sin diferenciación.	HE	~	~	~
VRb2	HE= mantenimiento de la viabilidad del tejido, sin diferenciación. C= necrosis del callo.	HE, C	~	~	~
VRb3	HE= necrosis del tejido.	HE	~	~	~
VRb4	HE= rompimiento de epidermis, división celular, 62 días después desarrollo de hojas bien diferenciadas, 35 días mas tarde formación de rosetas perfectamente diferenciadas. C= división celular, una tendencia a la diferenciación pero aún no es clara.	HE, C	~	✓	✓
C-5	HE= necrosis del tejido en 15 días. C= necrosis del tejido en 15 días.	HE,C	~	~	~
K-12	HE= necrosis del tejido en 15 días.	HE	~	~	~



En el medio VRc se sembró la mayor diversidad de material vegetal (Cuadro 11), por lo que se obtuvieron diferentes respuestas. Las hojas más “viejas” (de la parte basal de una planta adulta), comenzaban a hidratarse, hasta que la epidermis se rompía y quedaba expuesto el mesófilo, después de esto la hoja comenzaba a tornarse de un color negro, hasta llegar a la necrosis del material sembrado. Caso contrario ocurrió en las hojas del ápice y en hojas de roseta propagada por esqueje (las cuales, eran mucho más jóvenes que las del ápice), en las primeras, se observó el desarrollo y crecimiento del callo en 20 días (Fig. 29), un poco más a los obtenidos por Wojciechowicz *et al.* (2001), quienes obtuvieron callos de las hojas cercanas al ápice en 15 días y 42 días para las hojas que se encontraban en la base de la planta, mientras que en este trabajo las hojas provenientes de roseta propagada por esqueje, el tiempo fue en promedio de 50 días (Fig. 30). Estas variaciones en el tiempo de respuesta del tejido pudieron deberse a la edad de las hojas y su permeabilidad, ya que se ha visto que la habilidad de regeneración de cada órgano varía con la edad, esto sustenta lo obtenido por Wojciechowicz *et al.* (2001), quienes mencionan, que las hojas que tienen una alta capacidad de regeneración son las cercanas al ápice.

Los callos que se obtuvieron en este trabajo se presentaron en raras ocasiones de color amarillento, por lo general fueron verdes y friables (Fig. 31), a diferencia de los obtenidos por Wojciechowicz *et al.* (2001), los cuales fueron friables, vitrificados, amarillos y después de un tiempo se tornaron verdes, también hacen mención en la rápida e intensiva regeneración de callo que se observó en la parte media de la hoja, pero en este estudio, el crecimiento se observó hacia la periferia de las hojas.

En lo que respecta a los tallos sembrados, estos no tuvieron crecimiento alguno, por el contrario, a los 3 días de ser colocados en condiciones *in vitro* necrosaron, por lo que no fue recomendable extraer todo el material vegetal de un organismo para obtener el tallo, una mejor opción, fue tomar hojas de la base y por medio de esquejes, obtener pequeñas rosetas, las cuales fueron un material que facilitaban el manejo de las plantas (Fig. 32), con fines de realizar cultivo de tejidos.



Las hojas provenientes de rosetas cultivadas por esqueje (Cuadro 11) sembrados en el medio VRr, desarrollaron callo, sin embargo su crecimiento fue muy lento y menos opulento que el medio VRc, en este medio se colocaron callos provenientes de VRc, éstos no mostraron ningún crecimiento, manteniéndolos solo viables. Esto mismo ocurrió, pero con hojas provenientes de rosetas cultivadas por esqueje, en los medios de VRb1 y VRb2, que mantuvieron viables las hojas pero sin cambios aparentes. En estos medio de cultivo se utilizó BAP, debido a que en estudios de propagación de suculentas, la BAP ha sido usada con mucha frecuencia (Starling y Dodds, 1983), sin embargo, en lo que respecta a *E. laui*, no presentó efecto alguno en la diferenciación del tejido.

El callo proveniente del medio VRc, que se colocó en VRb2, este no sobrevivió, y terminó necrosándose, tomando un color pardo, hasta llegar a tonalidades blanco/transparente y a la pérdida de viabilidad (Fig. 33), lo mismo ocurrió con los medios VRb3, C-5 y K-12, los cuales fueron realizados en base a los medios que Wojciechowicz *et al.* (2001) desarrollaron en su trabajo, sin embargo estos no generaron, ni mantuvieron, en ninguno de los casos material viable, tampoco el medio C-5, el cual se elaboró con las características que mencionaron en el mismo artículo. Los resultados de este trabajo no mostraron lo reportado en el escrito de Wojciechowicz *et al.* (2001), quienes afirman que en el transcurso de 42 días obtuvieron el desarrollo de callos, en este trabajo no se obtuvo la formación de callos con el medio C-5 y el tejido se comenzó a necrosar en los primeros 15 días. Estos resultados se corroboraron, al colocar callos (obtenidos en el medio VRc) y hojas provenientes de rosetas cultivadas por esqueje, en medio de cultivo C-5. Los resultados se confirmaron en este segundo experimento que duró 48 días, es decir, los explantes necrosaron, al igual que los callos, ambos materiales comenzaban a tornarse pardos hasta llegar a un color blanquecino/transparente.

El medio VRb4 fue el único que logró brotes de *Echeveria laui*, a los 62 días de haber sido introducidas las hojas de roseta cultivadas por esqueje, se logró ver el desarrollo de hojas bien formadas en el material vegetal (Fig. 34), y a los 97 días se formaron rosetas perfectamente definidas (Fig. 35), además del desarrollo de raíces (Fig. 41) y la presencia de cera (Fig. 38), el



tiempo es un poco mas largo que el destinado por Wojciechowicz y colaboradores (2001), ya que mencionan haber obtenido primordios de hoja a los 56 días.

A diferencia de los medios VRb3, C-5 y K-12 que fueron basados en las concentraciones de Wojciechowicz (*op. cit.*), VRb4 se realizó agregando auxinas, las cuales son usadas comúnmente para la propagación de suculentas (Starling y Dodds, 1983).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Los tejidos obtenidos de cultivo *in vitro*, procesados con HMDS, no mostraron colapso celular (Figs. 36-39), como lo mencionan Araujo (2003) en células de *Methanosaeta* sp. corroborando también los resultados de Rejero (2009) en donde afirma que el HMDS es un método idóneo para introducir fragmentos de *Echeveria laui* y probablemente de otros miembros de la familia de las crasuláceas, al análisis de Microscopia electrónica de Barrido.

Las fotografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido, mostraron en los callos sembrados en medio VRc, un cumulo de células no diferenciadas (Fig. 36).

Las hojas desarrolladas en los tejidos colocados en medio VRb4, tuvieron una clara diferenciación del tejido epidérmico y se observó la formación de estomas (Figs. 37, 38), los callos sembrados en este medio de cultivo, presentaron después de 35 días, crecimiento celular y una posible diferenciación, como lo mostraron las fotografías de microscopia electrónica de barrido, en donde se apreció una estructura que podría derivar a epidermis (Fig. 39).

Al capturar las fotografías de las semillas de *E. laui*, se detectaron 2 diferentes tipos de semillas, unas que se observaron robustas y muy ornamentadas, las cuales por medio de pruebas de germinación se determinó que eran viables (Fig. 28), el otro tipo de semillas eran planas y sin ornamentación (Fig. 27), éstas ultimas, *in vivo* presentaban una tonalidad roja muy tenue y no fueron viables según las pruebas de germinación que se les realizó.



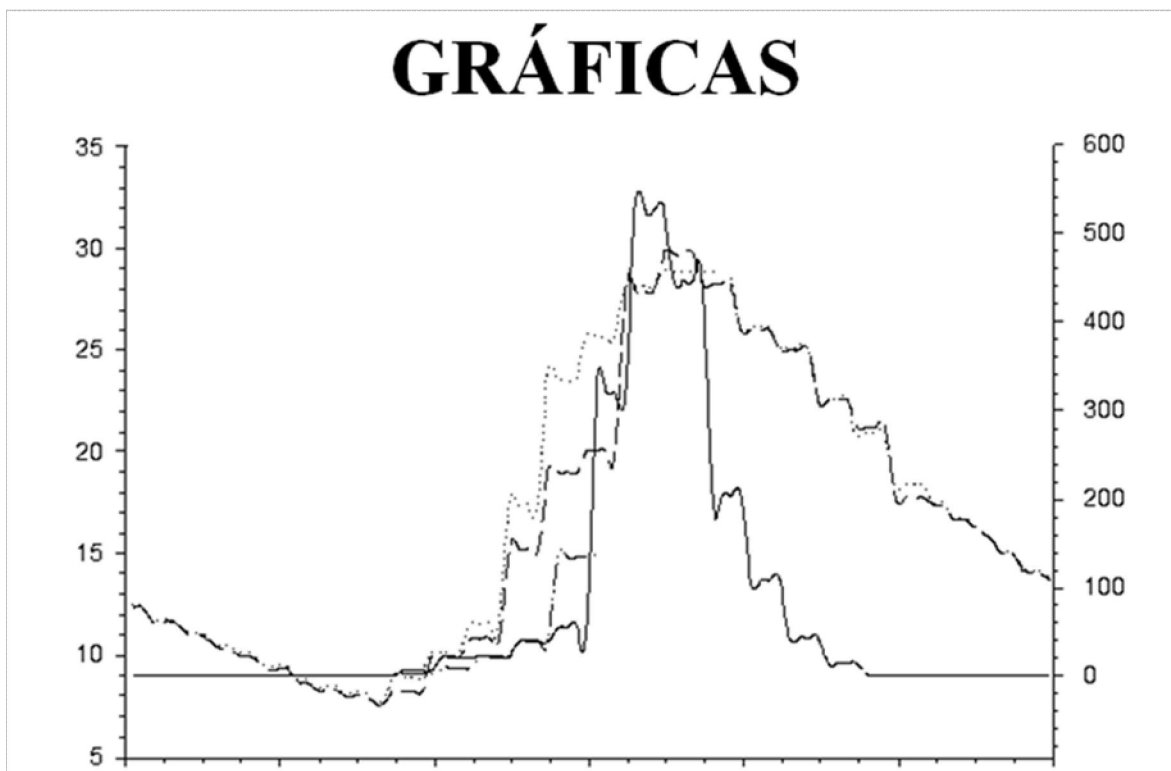
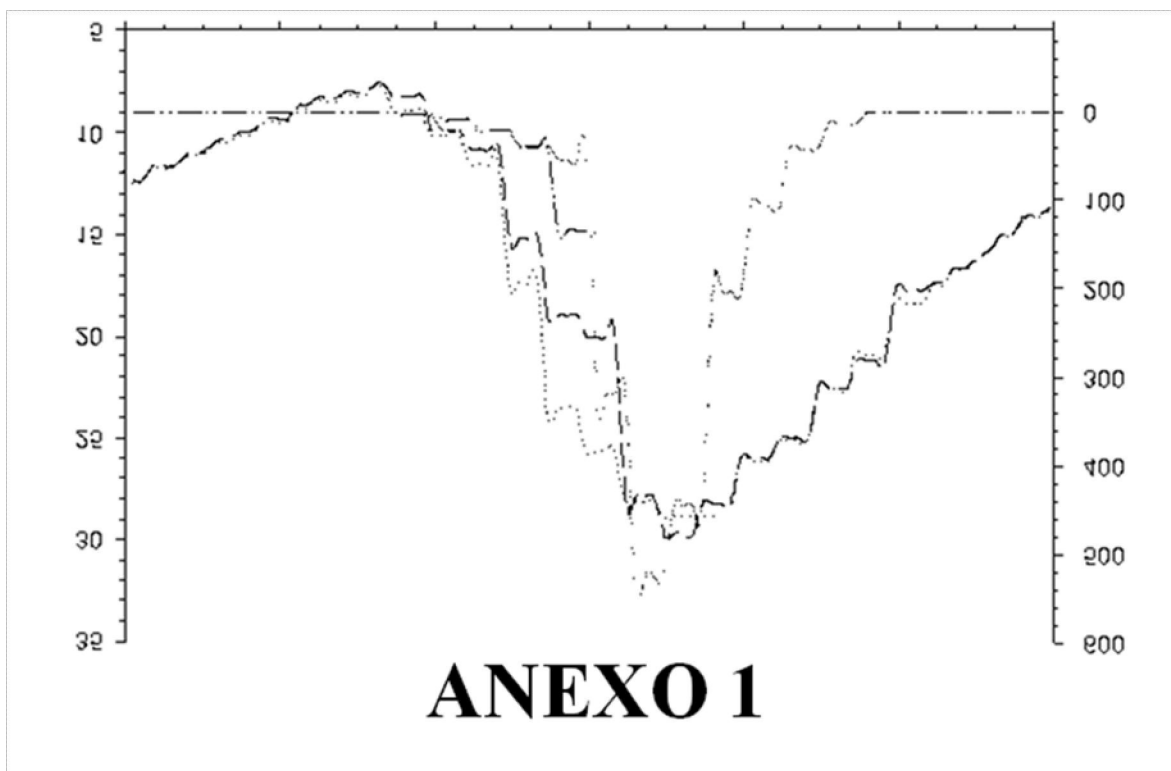
CONCLUSIONES

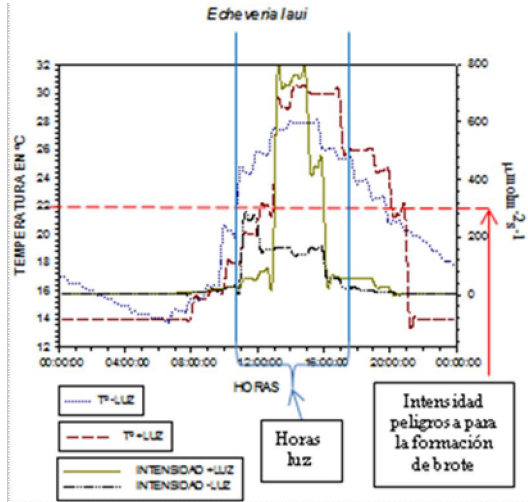
- La propagación vegetativa por medio de esquejes de hoja, generó organogénesis completa y no puso en riesgo la sobrevivencia de las plantas madre.
- Intensidades luminosas de $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, fueron nocivas para la reproducción vegetativa de *E. laui*.
- Soluciones acuosas de AIB 500 y 1000 ppm, promueven el desarrollo de raíz en esquejes de *E. laui*.
- El desarrollo de raíz en los esquejes de hoja de *E. laui*, no fue el factor que promovió o garantizó la formación de rosetas.
- El tratamiento “N” del experimento 5 garantizó el 60~70%, en formación de rosetas de *E. laui*.
- El sustrato no fue indispensable, para propagar por esqueje de hoja *E. laui*.
- Las semillas de *E. laui* se comportaron como fotoblásticas estrictas.
- Las semillas de *E. laui*, fueron sensibles a la oscilación de temperatura y necesitaron 280 días de maduración para que las semillas de *E. laui*, aumentaran el porcentaje de germinación a un 80 %.
- La propagación por medio de esqueje de hoja de *E. laui in vivo*, facilitó el manejo en la introducción del material vegetal a cultivo *in vitro*.
- En hojas jóvenes de *E. laui*, se promovió una mayor división celular en cultivo *in vitro*.
- El medio VRc, promovió el desarrollo y mantenimiento de callos friables de *E. laui*.
- El medio VRb4, promovió la diferenciación celular de *E. laui*, a hojas, rosetas y raíces perfectamente definidas.
- El medio C-5, no estimuló el desarrollo de callo, ni mantuvo la viabilidad y crecimiento de callos provenientes del medio VRc.



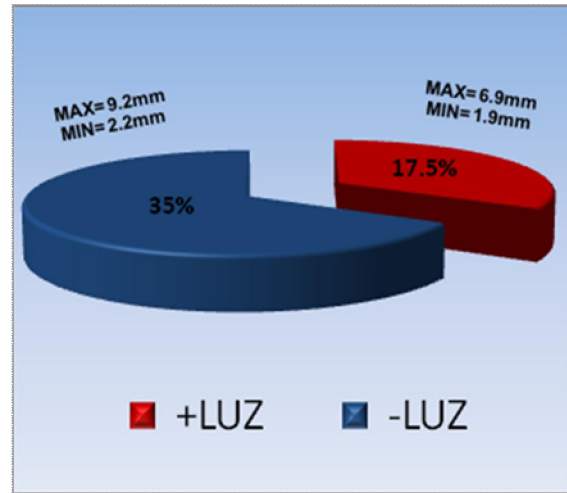
SUGERENCIAS PARA TRABAJOS POSTERIORES

- Obtener muestras de una población de *Echeveria laui* en campo y aislar RNAm, para determinar en que proporción, la reproducción se da, por vía sexual y vegetativa.
- Investigar los mecanismos que intervienen en la formación de raíz, cuando los esquejes de *E. laui* se colocan en obscuridad, después de un estrés hídrico o térmico.
- Cuantificar la capacidad de regenerar mas de una rosetas en un mismo esqueje de hoja de *E. laui*.
- Definir un método para garantizar el establecimiento dentro y fuera de un invernadero, de plantas *E. laui*, provenientes de propagación vegetativa *in vivo* e *in vitro*.
- Realizar pruebas de viabilidad en semillas de *E. laui*, que se almacenen en diferentes condiciones ambientales.

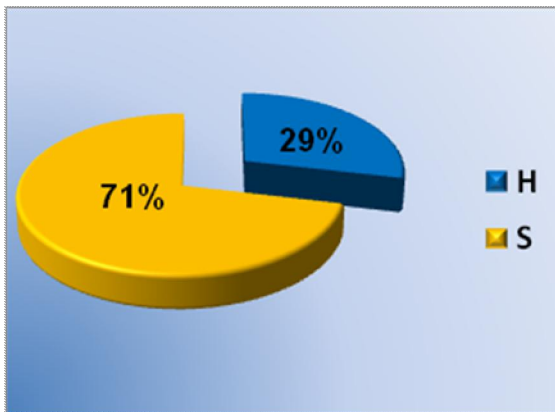




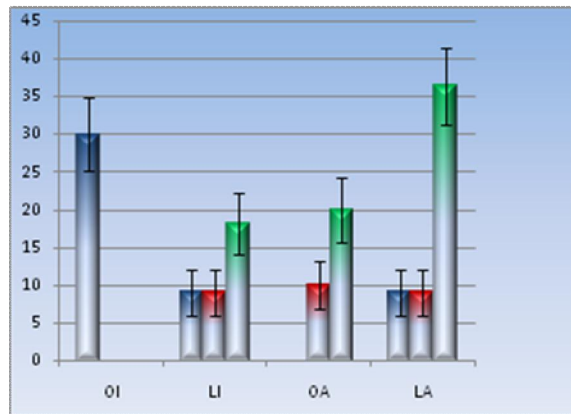
Gráfica 1.- Intensidades luminosas y temperaturas promedio de 3 días, registradas cada hora.



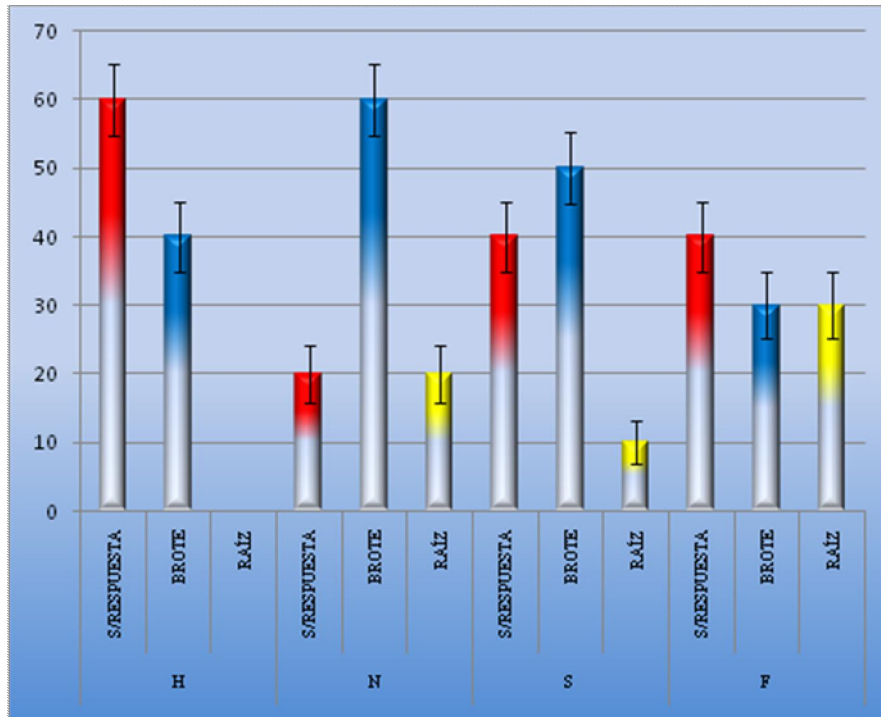
Gráfica 2.- Porcentajes del total de brotes obtenidos durante 2 meses en -luz y +luz, con tamaños máximos y mínimos de las rosetas.



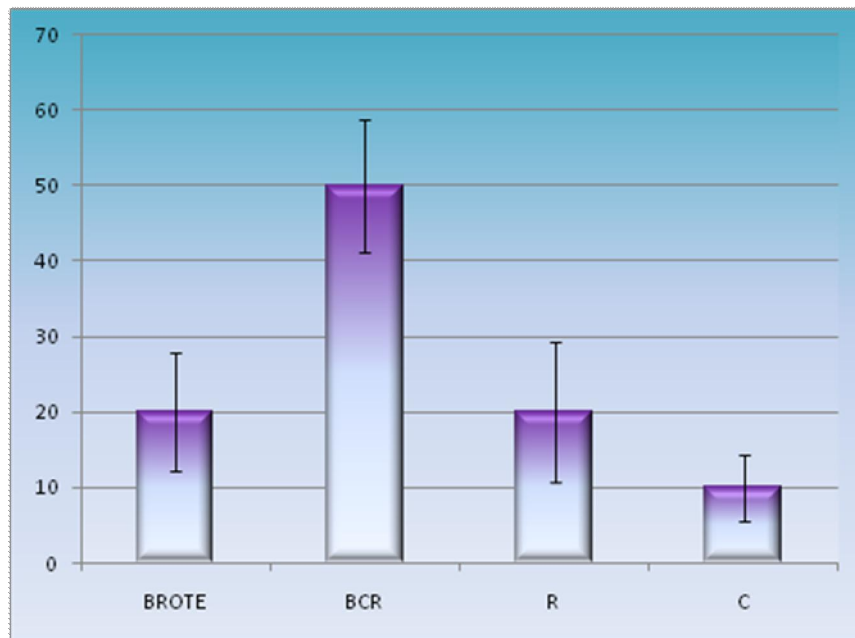
Gráfica 3.- Porcentajes obtenidos del total de brotes durante 2 meses con sustratos a una CC de 41.21% (H) y 1.95% (S).



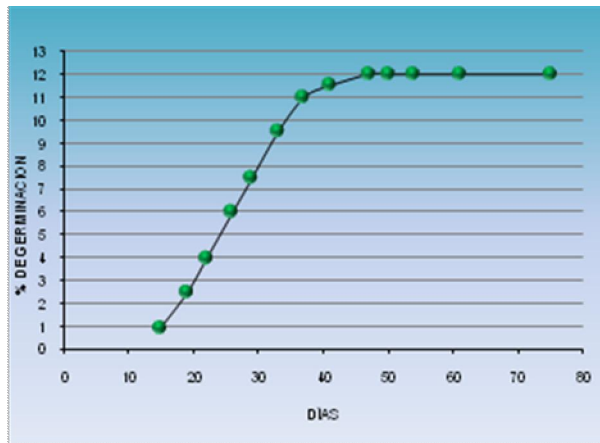
Gráfica 4.- Porcentajes de la formación de raíz, brote y brote con raíz, en un periodo de dos meses en las diferentes intensidades de luz y temperatura, donde:
OI=9-29°C/Obscuridad, LI=9-29°C/0.81-2.65 μmol m⁻² s⁻¹,
OA=21-23°C/Obscuridad y LA=21-23°C/30 μmol m⁻² s⁻¹.



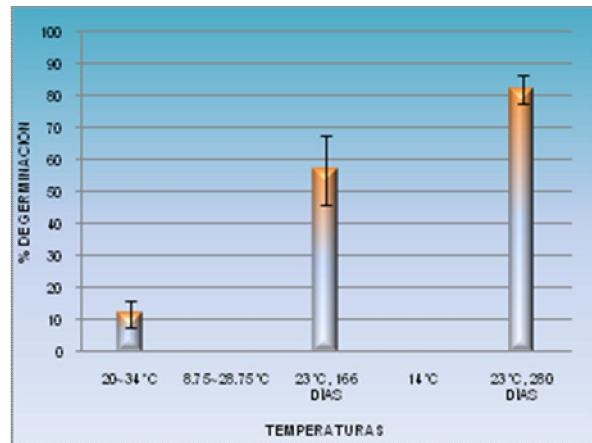
Gráfica 5.- Porcentajes de "H" (caja de plástico con tapa, sustrato CC 41.21 %, HR 78.4-92.5%), "N" (caja de plástico con tapa, sin sustrato, HR 28.1-47.4%), "S" (caja de plástico con tapa, sustrato CC 1.95 %, HR 30.5-36.2%) y "F" (superficie de aluminio sin tapar, HR 29-87%), divididos en "BROTE", "RAÍZ" y "SIN RESPUESTA".



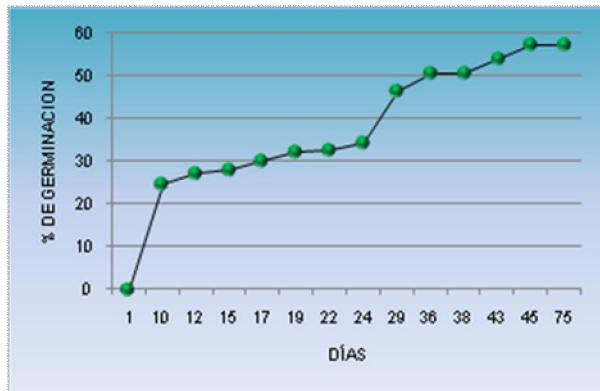
Gráfica 6.- Respuestas de los esquejes de *E. laui* en condiciones de "N", donde: Brote= hojas dispuestas en forma de roseta, BCR= hojas dispuestas en forma de roseta y con presencia de raíz, R= desarrollo únicamente de raíz, C= cumulo de células no diferenciadas (callo).



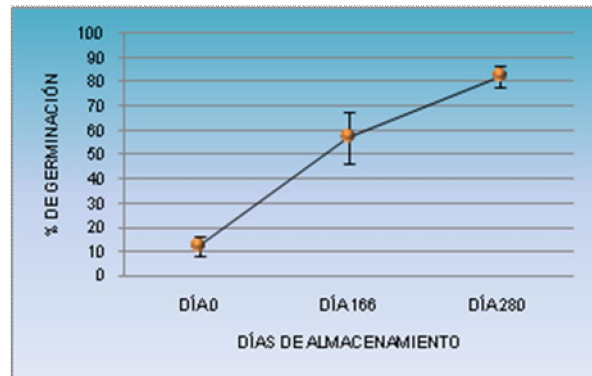
Gráfica 7.- Germinación de semillas de *E. laui* presentada en porcentajes, colocadas el primer día de su recolección, en una temperatura de 20-34°C, con una intensidad luminosa de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 16:8 luz/obscuridad.



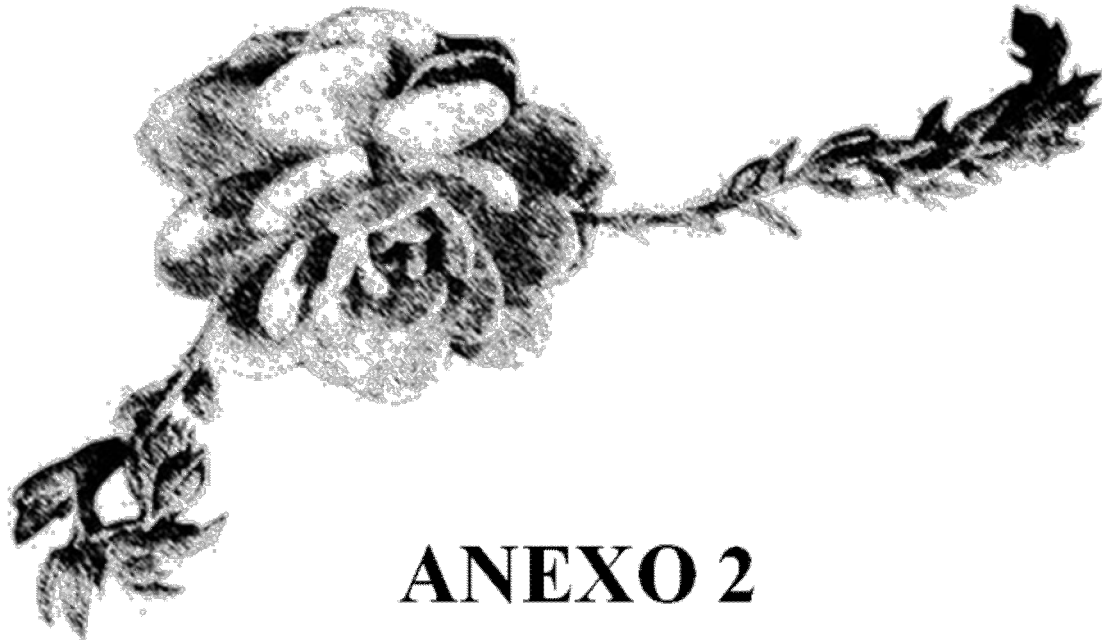
Gráfica 8.- Respuestas de las semillas de *E. laui* en las diferentes temperaturas en las que se colocaron a germinar.



Gráfica 9.- Germinación de semillas de *E. laui* presentada en porcentajes, colocadas después de 166 días de su recolección, en una temperatura de 23°C, con una intensidad luminosa de 18.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 16:8 luz/obscuridad.



Gráfica 10.- Porcentajes de germinación de semillas de *E. laui*, obtenidos en 3 diferentes tiempos de almacenaje, colocadas durante 75 días en cada caso, con un fotoperiodo 16:8 luz/obscuridad (día 0= 20-34°C y 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$, día 166 y 280=23°C y 18.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$).



ANEXO 2

FIGURAS





Fig. 1.- Desprendimiento de hojas de *Echeveria laui* de la parte basal de la planta adulta.



Fig. 2.- Acumulación de hojas secas, formando un "colchón" en la base de *Echeveria laui*.

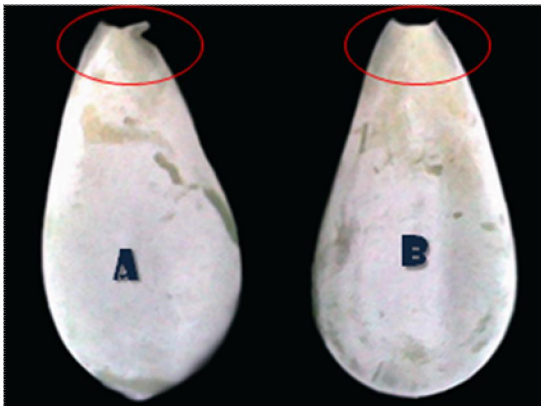


Fig. 3.- En la forma "A", se muestra una hoja con la parte basal de la hoja dañada, al desprenderla de la planta madre, en la forma "B", se observa perfectamente la forma de luna que deben tener las hojas de *Echeveria laui*, al desprenderla.

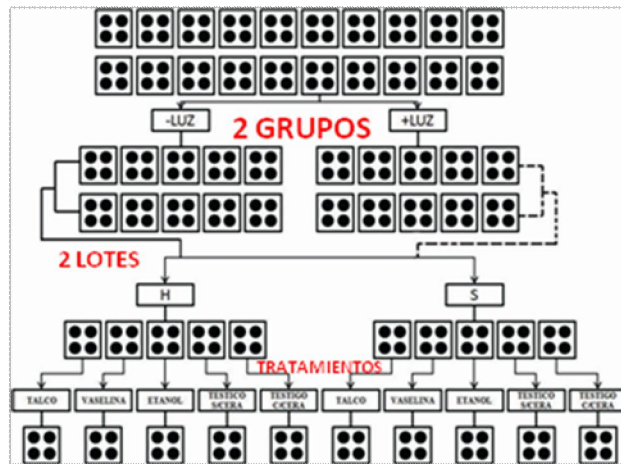


Fig. 4.- Diagrama que muestra como se dividieron las cajas utilizadas en el experimento 1, divididas en grupos, lotes y tratamientos.



Fig. 5.- Esquejes de "HE", señalando hasta donde fue enterrada la hoja de *E. laui*.



Fig. 6.- Hojas de *E. laui*, divididas en luz y oscuridad, "a" en condiciones controladas, "b" condiciones fluctuantes.

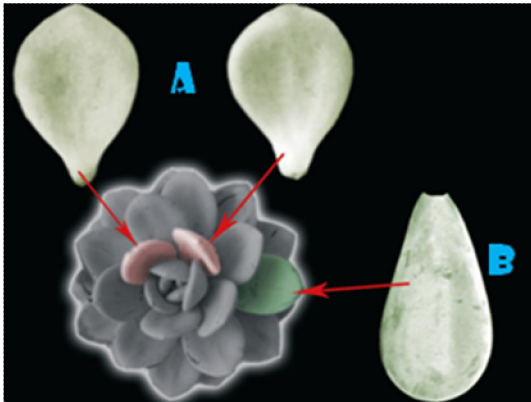


Fig. 7.- *Echeveria laui*, señalizando "A" que son las hojas cercanas al ápice (no recomendadas para reproducción vegetativa) y "B" hojas de la base (viables para reproducción).

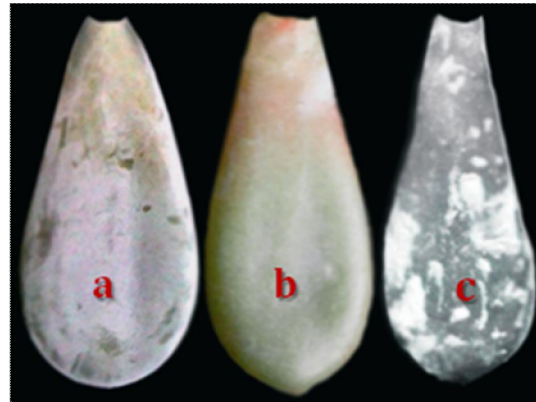


Fig. 8.- Esquejes de *E. laui*, "a"= hoja recién cortada con ceras, "b"= hoja sin cera, sumergida en alcohol, "c"= hoja con talco espolvoreado.



Fig. 9.- Esquejes de *E. laui*, desarrollando rosetas. -Luz= esqueje con tonalidad rojiza en la parte meristemática, +Luz= hoja con tonalidad roja, en toda su superficie.

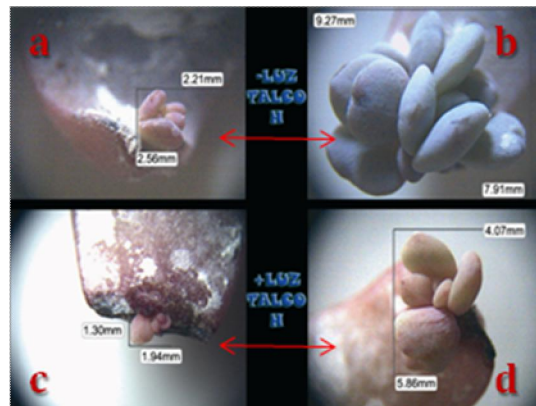


Fig. 10.- Tamaños máximos y mínimos de brotes de *E. laui*, desarrollados a partir de esquejes expuestos al tratamiento de "Talco H", donde: a y b= son brotes bajo intensidades de $0.81-265 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ c y d= rosetas bajo una luminosidad de $1.795-760 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$



Fig. 11.- Tamaños de rosetas desarrolladas en esquejes de *E. laui* durante 3 meses.

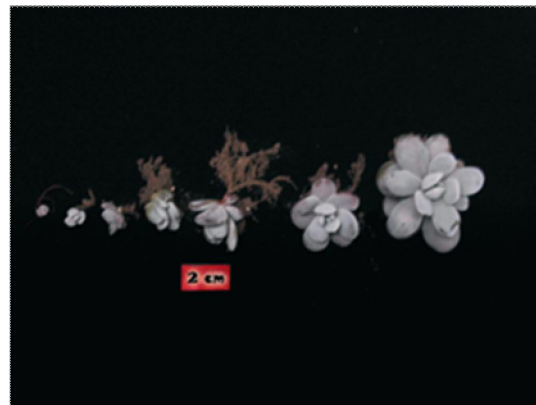


Fig. 12.- Diferentes tamaños de rosetas de *E. laui*, propagadas por esqueje de hoja.

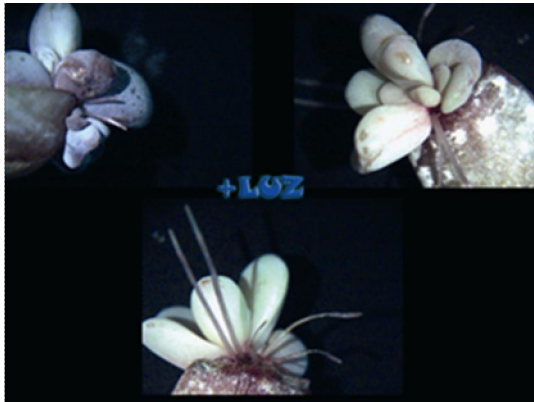


Fig. 13.- Brotes de "+LUZ" que desarrollaron raíz al colocarlos en obscuridad.

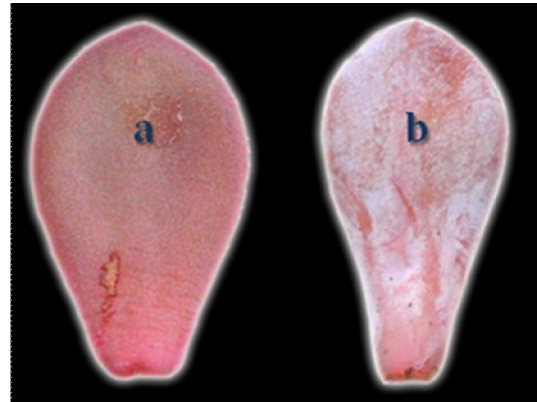


Fig. 14.- Coloración rojiza de los esquejes de *E. laui*, "a" = testigo sin cera, "b" = testigo con cera.

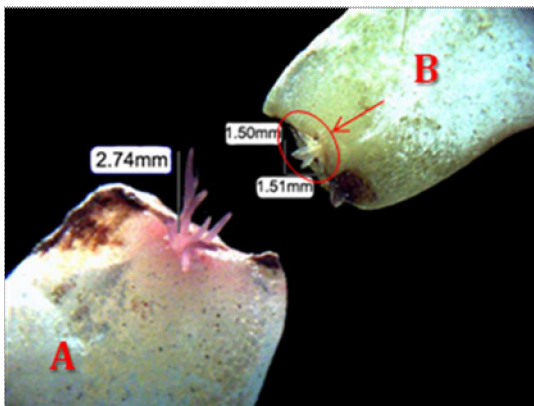


Fig. 15.- Desarrollo de raíces en esquejes de *E. laui*, A = obscuridad en temperatura fluctuante y B = obscuridad con temperatura controlada.



Fig. 16.- Secuencia de la formación de brote, en propagación vegetativa por esqueje.

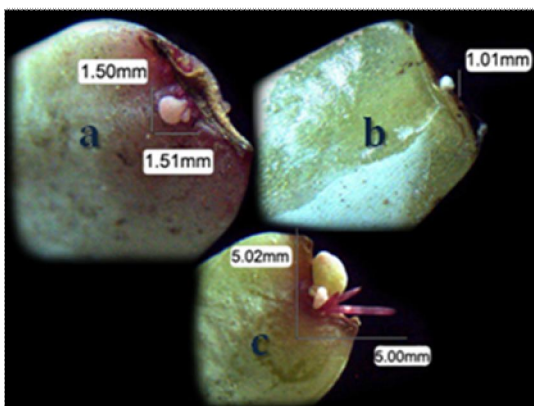


Fig. 17.- Brotes de *E. laui*, propagados por esqueje de hoja, en el experimento 3, donde: a = corresponde al tratamiento LI (9-29°C/0.81-26.5mmolm⁻³s⁻¹), b = al tratamiento OI (9-29°C/Obscuridad) y c = a LA (21-23°C/30mmolm⁻³s⁻¹).

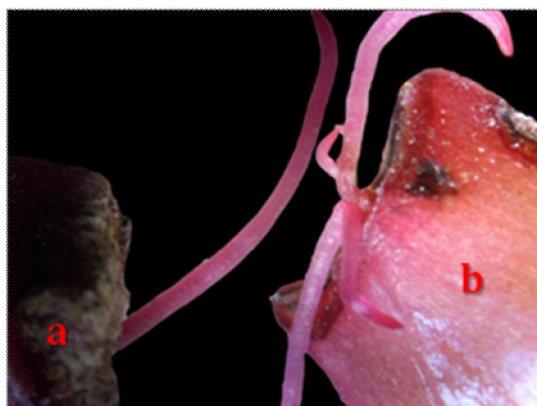


Fig. 18.- Desarrollo de raíz en tratamientos: a) MEDIO (90.69mmolm⁻³s⁻¹, 23-38°C) y b) BAJO (21.53mmolm⁻³s⁻¹, 23 a 32°C).

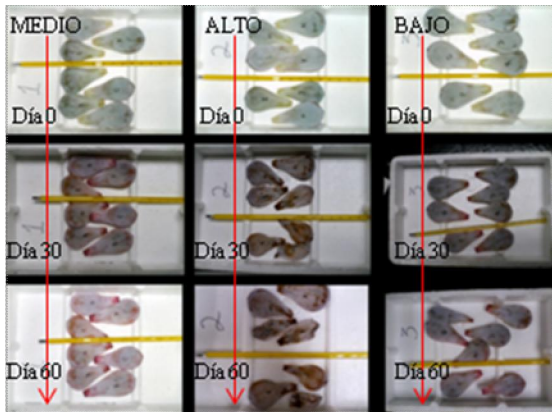


Fig. 19.- Esquejes de *E. laui*, colocados en el experimento 4, mostrando la secuencia del cambio de coloración y turgencia, del día cero, al día 60.

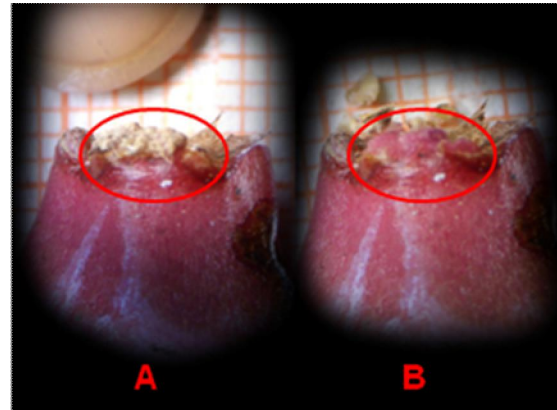


Fig. 20.- Formación de "callo", en propagación por esqueje, "A"= muestra el callo, cubierto con una capa de tejido seco, "B"= el mismo "callo", sin la cubierta.

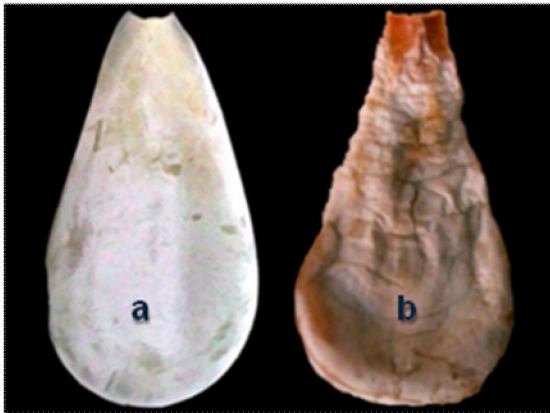


Fig. 21.- Esquejes de *E. laui*, a) Recién desprendidos de la planta madre y b) Después de mantenerlos 60 días en temperatura ALTA.

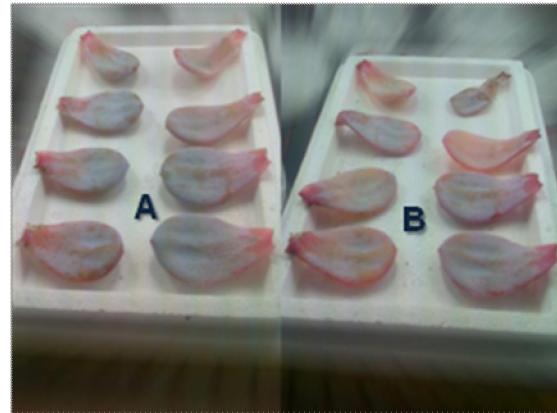


Fig. 22.- Esquejes de *E. laui*, en temperatura de 14°C, A= 7 días después de colocarlas presenta una coloración rojiza, B= 60 días después se observa la pérdida de agua.

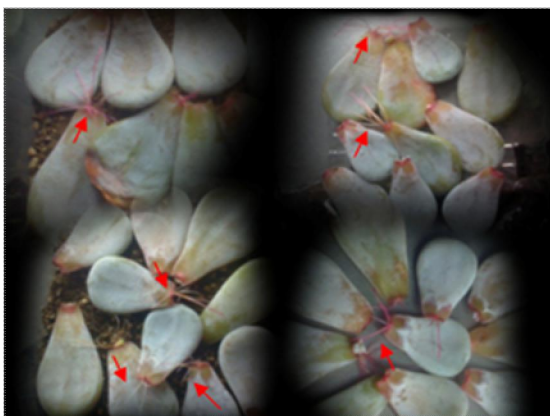


Fig. 23.- Raíces alargadas y delgadas, desarrolladas por esquejes de *E. laui*.



Fig. 24.- Raíces desarrolladas en 21 días, por esquejes de hoja medianos de *E. laui* (todos los esquejes, enraizaron, excepto 3 que murieron).

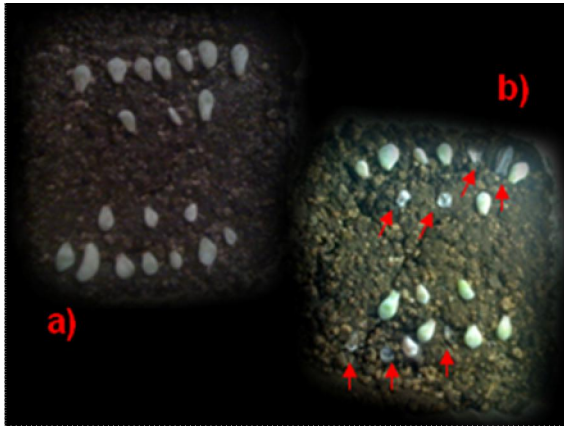


Fig. 25.- Esquejes chicos de *E. laui*, a) con un día de haberse colocado, b) hojas con 37 días de colocarlas para propagar vegetativamente, se muestra la pérdida de viabilidad.

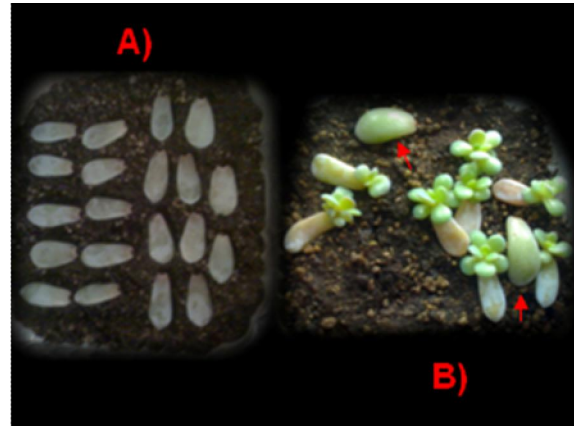


Fig. 26.- Esquejes MEDIANOS de *E. laui*, A) recién desprendidos de rosetas propagadas vegetativamente, B) 10 meses después de haberse colocado se observan 8 brotes y dos hojas señaladas que desarrollaron solo raíz.



Fig. 27.- Fotografías de microscopía electrónica de barrido, en donde se muestran semillas de *E. laui*, viables (rojas, robustas y ornamentadas) y no viables (rojas muy tenue, planas y sin ornamentación).

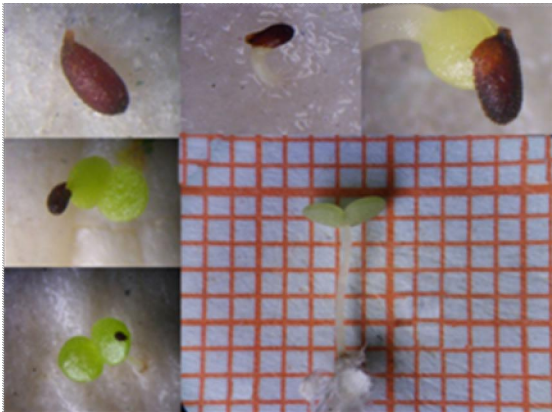


Fig. 28.- Proceso de germinación de semillas viables (rojas, robustas y ornamentadas) de *E. laui*,

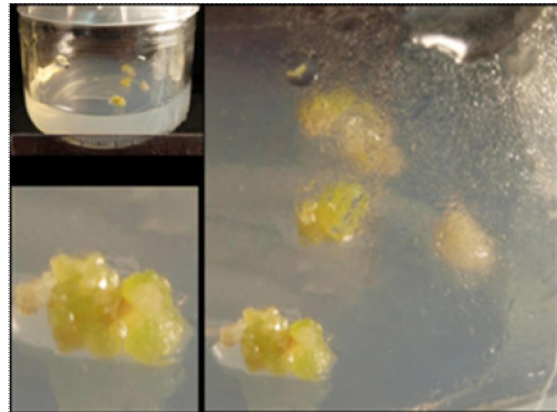


Fig. 29.- Callos de *E. laui* propagados *in vitro*, en medio VRc, provenientes de hojas del ápice.



Fig. 30.- Callos de *E. laui* propagados *in vitro*, en medio VRc, provenientes de hojas de rosetas propagadas por esqueje.

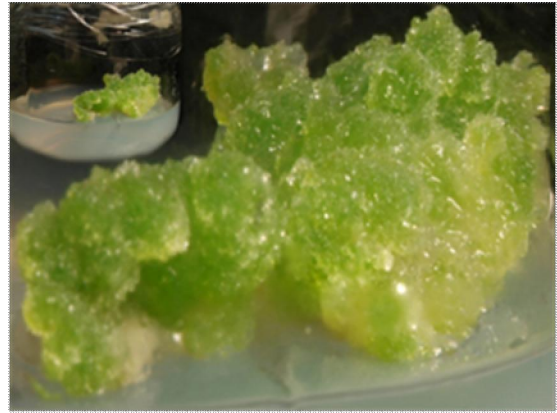


Fig. 31.- Callos verdes y friables de *E. laui*, propagados *in vitro*, en medio VRc.

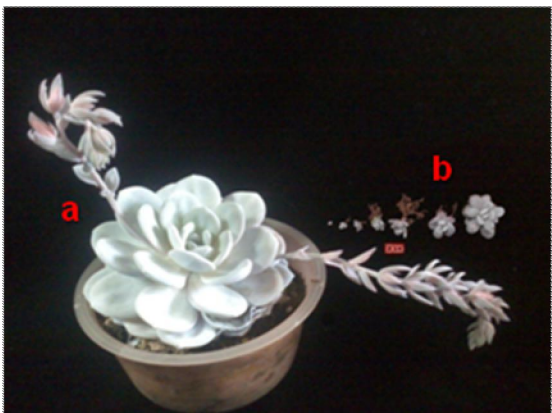


Fig. 32.- Material vegetal disponible para micropropagación, a= *E. laui* adulta, b= rosetas de *E. laui* provenientes de propagación vegetativa por esqueje de hoja.

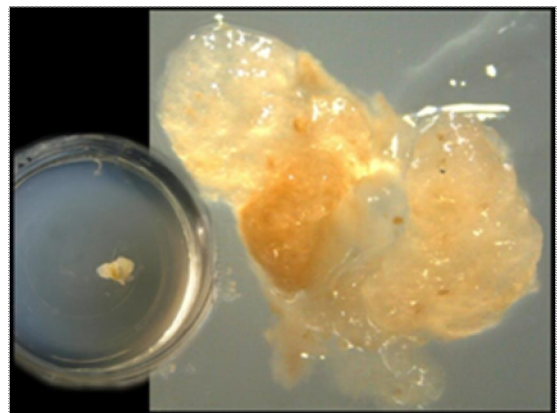


Fig. 33.- Material vegetal necrosado.

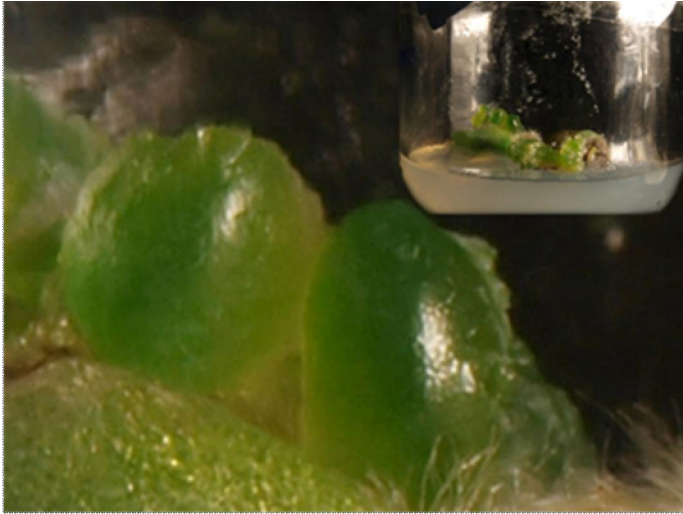


Fig. 34.- Desarrollo de hojas de *E. laui* inducidas por el medio VRb4.

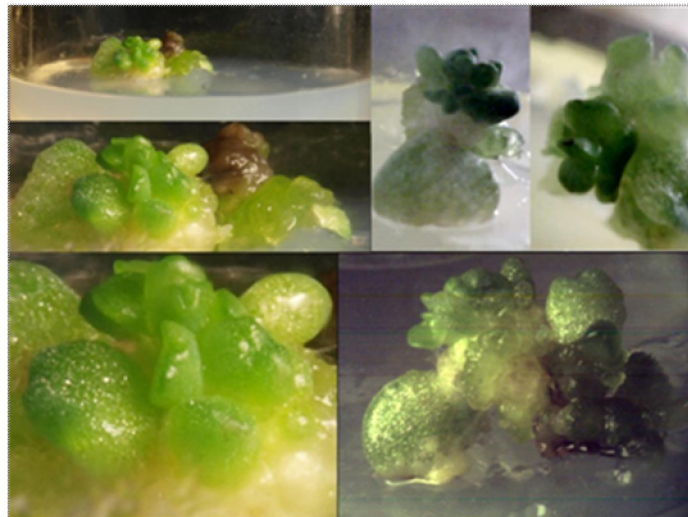


Fig. 35.- Desarrollo de rosetas de *E. laui*, promovidas por el medio VRb4.

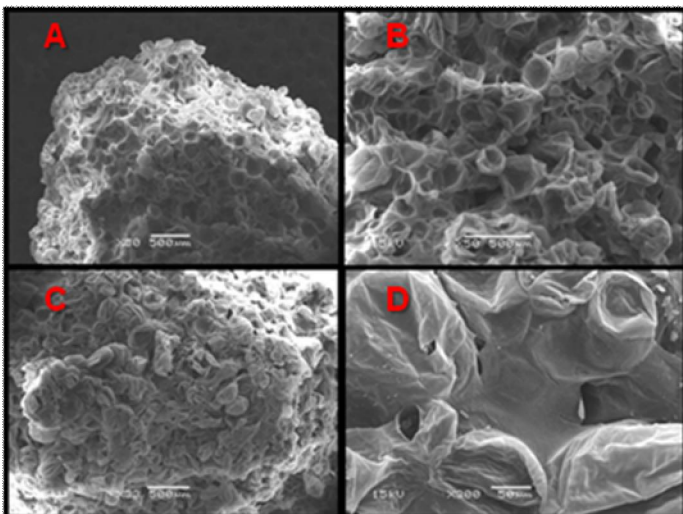


Fig. 36.- Callos tratados con HMDS, mantienen la forma y no muestran colapso celular A, B y C= Fotografías de callos, propagados en medio VRc, tomadas con microscopio electrónico de barrido, donde se observa la agrupación de células de *E. laui* sin diferenciar. D= división celular del callo de *E. laui* cultivado en medio VRc.

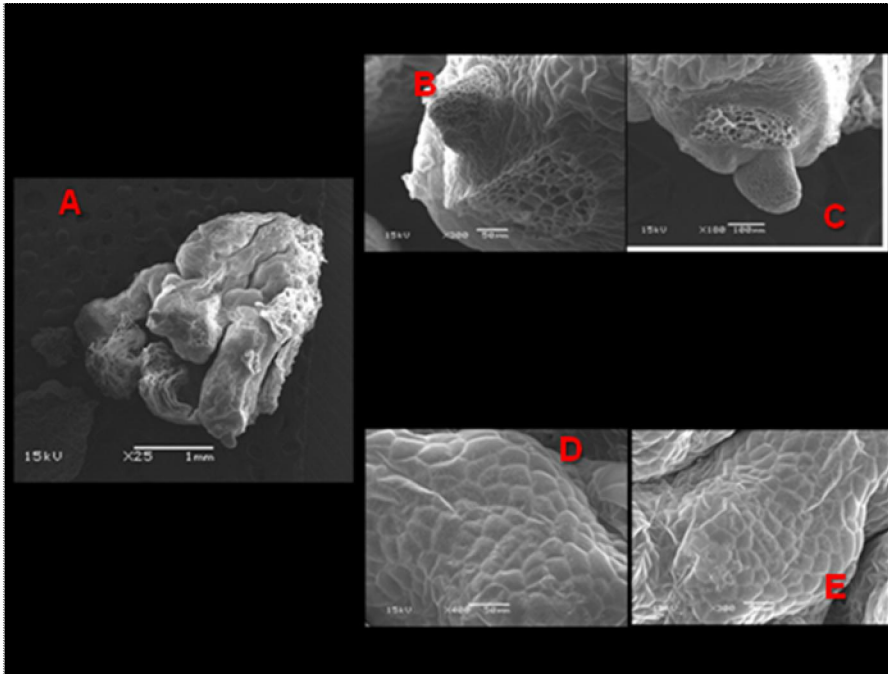


Fig. 37.- Brotes tratados con HMDS mantienen la forma y no muestran colapso celular, A, B, C=Fragmento del material vegetativo de *E. laui*, que se colocó en medio VRb4, D, E= se observa la diferenciación celular a tejido epidérmico de *E. laui*.

Fig. 38.- hojas tratadas con HMDS mantienen la forma y no muestran colapso celular, a) hoja de *E. laui* inducida por el medio VRb4, b), c), d), e), f) se observa una diferenciación y desarrollo de estomas en el tejido de la hoja de *E. laui* cultivada *in vitro*, g) Estoma de *E. laui* desarrollado *in vitro*, con presencia, de cera.

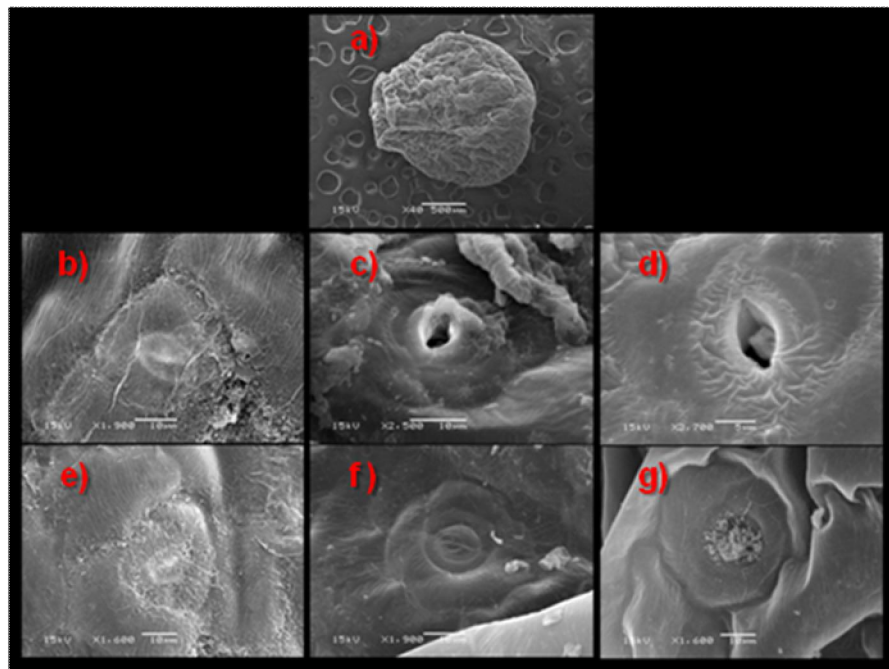




Fig. 39.- Callos tratados con HMDS mantienen la forma y no muestran colapso celular, a y b= callo proveniente de medio VRc y trasplantado a medio VRb4, c y d= muestran parte del tejido, donde se observa, una zona celular lisa del callo que podría derivar a tejido epidérmico.

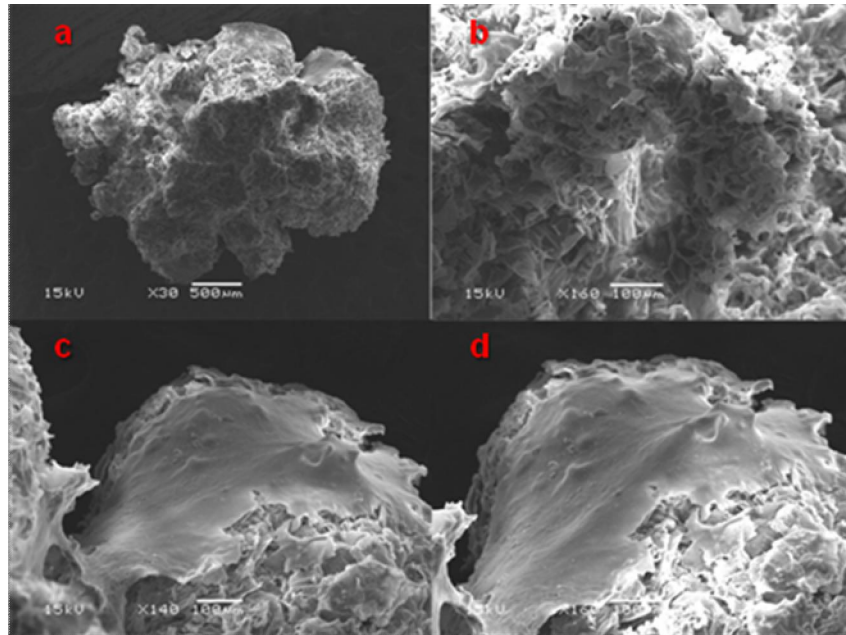


Fig. 40.- Secuencia de imágenes tomadas en el transcurso de 90 días, que muestran, la recuperación de *E. laui*, después de ser deshojada. Debido a cambios ambientales (granizo), no se logró obtener la foto del día 90, sin embargo, aún con los daños es posible visualizar la recuperación de la planta.

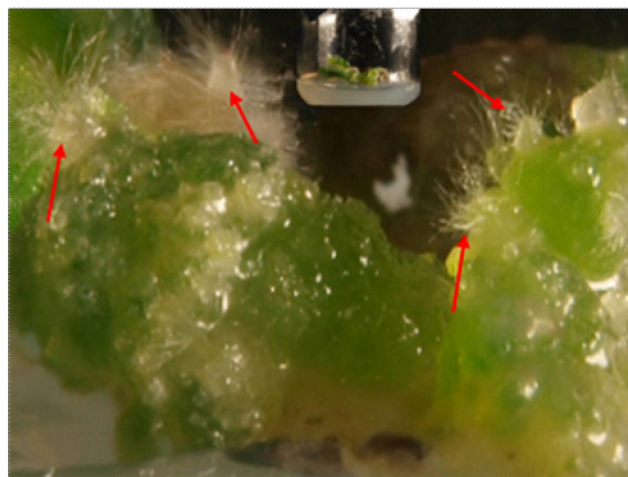


Fig. 41.- Explante sembrado en Medio VRb4, señalando el desarrollo de raíces.



ANEXO 3

MEDIO MS



MEDIO MS (MURASHIGE Y SKOOG, 1962)

SOLUCIÓN A (elementos mayores)

Compuesto	Pesar en gramos
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3.7
KH ₂ PO ₄	1.7
CaCl ₂ . 2H ₂ O	4.4
KNO ₃	19.0
NH ₄ NO ₃	16.5

Se colocaron en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua destilada a un vaso de 1 litro, agitando constantemente, finalmente se aforó a 1 litro de solución y se guardó en frío.

SOLUCION B (elementos menores)

Compuesto	Pesar en miligramos
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2000
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	830
KI	83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25ml*
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5ml*
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5ml*

Se siguió el mismo procedimiento que para la solución A.

**Se preparó de cada compuesto una solución por separado conteniendo 100 mg del compuesto en 100 ml de agua destilada. De cada solución tomó la cantidad indicada.*

SOLUCIÓN C Na₂EDTA 373mg y FeSO₄. 7H₂O 278 mg en 100 ml de agua
destilada

Para preparar el medio finalmente se vertió un poco de agua destilada en un vaso de 1000 ml y se agregó en orden las siguientes cantidades, agitando constantemente.

SOLUCIÓN A 100 ml, SOLUCIÓN B 10 ml, SOLUCIÓN C 10 ml.



ABREVIATURAS

AIB	<i>Ácido Indolbutirico</i>
BAP	<i>Bencil Amino Purina</i>
CC	<i>Capacidad de Campo</i>
MS	<i>Murashige y Skoog</i>
HMDS	<i>Hexametildisilazano</i>
Å	<i>Ångström</i>



BIBLIOGRAFÍA

Acosta, C. S. 2002. Plantas Vasculares raras, amenazadas, o en peligro de extinción del estado de Oaxaca, un panorama preliminar. *Polibotánica*, 13: 47-82.

Araujo, J. C., Téran, F. C., Oliveira, R. A., Nour, E. A. A., Montenegro, M. A. P., Campos, J. R., Vazoller, R. F. 2003. Comparison of Hexamethyldisilazane and Critical Point drying Treatments for SEM Analysis of Anaerobic Biofilms and Granular Sludge. *Journal of Electron Microscopy*. 52(4):429-433.

Bray, D. F., Bagu, J., Koegler, P. 1993. Comparison of Hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc. Res. Tech.* 26:489-495.

Cervantes, S. E., Graham E. A. y Andrea, J. L. 2005. Light micro-habitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest. *Plant Ecology*, 179:107-118.

Dirzo, R. y Raven, H. 1994. Un Inventario Biológico para México. *Soc. Bot. México*, 55:29-34.

Franco, A. C., Nobel, P. S. 1989. Effect of nurse plants on the microhabitat and growth of cacti. *Journal of Ecology*, 77: 870-886.

Hartmann, T., Kester, D. 1988. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Continental, México. 727p.

IUCN. 1994. Categorías de las listas rojas de I UICN. 40ª. Reunión del Consejo de la UICN. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. 30 de noviembre de 1994. Gland, Suiza.

IUCN-CSE. 1999. Informe provisional sobre la revisión de los criterios de la Lista Roja de la IUCN. IUCN, U. K. pp. 22.

Laleh, G. H., Frydoonfar H., Heidary R., Jameei R. and Zare1 S. 2006. The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5 (1): 90-92.





- Meyrán, G. J., López, C. L. 2003. Las crasuláceas de México. Ed. Soc. Mex. De Cact. A. C. México, pp. 234.
- Mittermeier, R. A. y Goettsch, de M. C. 1992. La Importancia de la Diversidad Biológica en México. En: Sarukhán J y Dirzo R. edr. México Ante los Retos de la Diversidad. CONABIO. México, 63-73.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 18: 100-127.
- Paterson, K. E., Rost, T. L. 1979. Effects of Light and hormones on regeneration of *Crassula argentea* from leaves. *American Journal of Botany*, 66 (4): 463-470.
- Piña-Poujol, P., Valverde, T., Reyes-Santiago, J. 2007. Propagación de la especie en peligro de extinción *Echeveria laui* con fines de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 52 (1): 4-19.
- Reyes, S. J., Brachet, I. C., Pérez, C. J., Gutiérrez de la Rosa, A. 2004. Cactáceas y Otras Plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. Ed. Soc. Mex. De Cact. A. C. México, pp. 196.
- Reyero, S. M. R. 2009. Determinación de la dinámica estomática de *E. laui* (CRASSULACEAE) en individuos obtenidos de propagación vegetativa y sexual. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I).UNAM. México. (En impresión).
- Rivero, M. G. del C., Guerrero, R., Ramírez, M. 2005. Enraizamiento de estacas de semeruco (*Malpighia glabra* L.). *Rev. Fac. Agron.* 22(1):34-41.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México, pp. 432.
- Starling, R. J., Dodds, J. H. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1: 84-90.



Stevens, J., Hart, H., van Ham, T.R., Elema, E. T., van Den Ent, M. V., Wldeboer M., Zwaving, J. 1995. Distribution of Alkaloids and Tannins in the Crassulaceae Biochemical Systematics and Ecology, 23 (2): 157-165.

Villanueva, R. E., Sánchez, G. P., Rodríguez, M. N., Villanueva, N. E., Ortiz, M. E., Gutiérrez, E. J. 1998. Efecto de reguladores del crecimiento y tipo de sustrato en el enraizamiento de Kalanchoe. Terra, 16 (1): 33-41.

Tejero, D. J., Aguilar, R. S., Granillo, V. M., Pozos, B. G., Rico, M. R., Abundis, B. L. 1998. Plantae. Introducción al estudio de las plantas con embrión. Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. México. pp. 94.

Wojciechowicz, K. M., Kazimierczak-Grygiel, E., Olejnik, S., Zenkteler, E. 2001. Plant regeneration from leaf explants of *Adromischus nussbaumerianus* Poelln. and *Echeveria laui* Moran et Meyran. Biological Bulletin of Poznan.Poland, 38 (1): 71-78.

Weaver, R. J. 1990. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. México, pp 155, 157, 160.