



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación *in vitro* de *Nolina parviflora*
(Kunth) Hemsl

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIA CRISTINA MENDOZA ESTRADA



DIRECTORA DE TESIS:

M en C. LAURA PATRICIA OLGUIN SANTOS

CIUDAD UNIVESITARIA, CD. MX 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HOJA DE DATOS DE JURADO

1. Datos del alumno

Mendoza
Estrada
María Cristina
58 66 02 69
Universidad nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308272404

2. Datos del tutor

M. en C.
Laura Patricia
Olguín
Santos

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Ana Laura
López Escamilla

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Ávila

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Alma Yadira
Martínez Rendón

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Helia Reyna
Osuna Fernández

7. Datos del trabajo escrito

Propagación *in vitro* de *Nolina parviflora* (Kunth) Hemsl
75 p.
2017

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias como parte del taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, bajo la dirección de la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las enseñanzas académicas y en la vida personal desde la preparatoria.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias por permitirme el acceso a las instalaciones y reactivos para poder llevar a cabo este trabajo.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos por su guía en este proyecto, por compartir sus conocimientos sobre las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y por el apoyo y la paciencia en todo momento. Así como el apoyo en el mantenimiento de los cultivos en las cámaras de ambientes controlados.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla por sus enseñanzas, apoyo y paciencia en el proceso de la realización de este proyecto y por hacer más amena la estancia en el laboratorio.

A la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, la M. en C. Alma Yadira Martínez Rendón y al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por su revisión y comentarios que ayudaron al enriquecimiento de este proyecto.

A las profesoras del taller Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Karina Jiménez Duran, Dra. Ana Laura López Escamilla y M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, por ser un ejemplo para todas las mujeres que deciden dedicar su vida a la ciencia.

Personales

A mis padres Yolanda Ortiz Álvarez y Mario Felipe Ruíz por su apoyo, paciencia y amor que me han dado toda la vida, por enseñarme que la mejor manera de lograr nuestros objetivos es con esfuerzo y sacrificio.

A mi hermana Emma por ser ese apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida y por darme motivación cuando quería darme por vencida.

A toda mi familia por hacer de mi vida una aventura cada día.

A Zeltzin por aguantarme tantos años y estar siempre ahí, aun cuando el tiempo y la distancia nos separen.

A Erika, gracias por ser un ejemplo de fortaleza y tenacidad. Gracias por ser una gran amiga y un motivante para continuar.

A mis amigos y compañeros de laboratorio. Erika, Claudio, Kevin, Rosi, por hacer que la estancia en el laboratorio fuera más divertida y amena.

A mis compañeros y amigos de Universum, museo de las ciencias; Jacquie, por enseñarme cosas que jamás creí agregar a mi vida. A Marlene por ser una excelente persona y estar ahí cuando te necesitamos. A Jesús por enseñarme cosas que no sabía que me gustaban. A Ulises, Mayte, Ana Karen, Mariana y Sergio, gracias por enseñarme a trabajar en equipo, la tolerancia a ideas diferentes y abrirme los ojos a todo un universo.

A Jair, aunque no estuviste en todo este proceso me ayudaste a cerrar con broche de oro.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	13
Familia Nolinaceae	13
Género <i>Nolina</i>	16
<i>Nolina parviflora</i>	17
Sierra de Santa Catarina	19
Tipos de conservación	21
Cultivo de Tejidos Vegetales	22
Fitorreguladores	25
Micropropagación	27
Cultivo de tejidos en la familia Nolinaceae	29
JUSTIFICACIÓN	37
OBJETIVOS	37
METODOLOGÍA	38
Colecta de material vegetal	38
Desinfección superficial y escarificación de semillas	38
Siembra de semillas	39
Inducción de brotes	40
Ensayo preliminar	40
Micropropagación	41
Elongación y enraizamiento	41
Análisis estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Desinfección superficial y siembra de semillas	43
Ensayos de desinfección	44
Tratamiento de escarificación	44
Germinación de semillas	46
Descripción de la germinación <i>in vitro</i> de <i>N. parviflora</i>	47
Ensayo preliminar	49
Explantes de hojas	49
Explantes de tallos	49
Micropropagación	53
Enraizamiento	59

CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
Anexo I. Descripción botánica del género <i>Nolina</i> (Solano y Rivera-Lugo, 2012).	71
Anexo II. Descripción botánica y clasificación taxonómica de la especie <i>Nolina parviflora</i>.	72
Anexo III. Formulación y proporción de sales y componentes orgánicos presentes en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), 1962.	73

ABREVIATURAS

AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BA o BAP	6-benciladenina o 6-bencilaminopurina
b/e	Brotos por explante
CA	Carbón Activado
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
dds	Días después de la siembra
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
MS	Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	Medio Murashige y Skoog al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa.
MT	Metatopolina
NaClO	Hipoclorito de sodio
TDZ	Tidiazurón
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del tallo de <i>Beaucarnea</i> , <i>Calibanus</i> , <i>Nolina</i> y <i>Dasylyrion</i> .	13
Figura 2. Inflorescencia representativa de <i>Beaucarnea</i> , <i>Calibanus</i> , <i>Nolina</i> y <i>Dasylyrion</i> .	14
Figura 3. “Chimal”, flor artificial hecha con hojas de sotol (<i>Dasylyrion</i> sp.).	15
Figura 4. Ejemplar adulto de <i>Nolina parviflora</i> en floración, el tronco y la escasez de las hojas se deben a un incendio en la zona.	17
Figura 5. Distribución de <i>Nolina parviflora</i> .	19
Figura 6. Perfil longitudinal de la Sierra de Santa Catarina.	20
Figura 7. Esquema de los diferentes procesos morfogénéticos obtenidos a partir de la siembra <i>in vitro</i> de diferentes explantes.	24
Tabla 1. Comparación de diferentes sustancias empleadas para la desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de algunas especies de la familia Nolinaceae.	30
Tabla 2. Porcentajes de germinación <i>in vitro</i> de diferentes especies de la familia Nolinaceae.	32
Tabla 3. Trabajos reportados para la propagación y enraizamiento <i>in vitro</i> de diferentes miembros de la familia Nolinaceae.	34
Figura 8. Ejemplar adulto de <i>Nolina parviflora</i> en proceso de fructificación.	38
Tabla 4. Diferentes ensayos de desinfección realizados para el establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Nolina parviflora</i> .	39
Figura 9. Obtención de explantes de <i>N. parviflora</i> .	40
Figura 10. Método general para la propagación de <i>Nolina parviflora</i> .	42
Figura 11. Porcentaje de germinación acumulada <i>in vitro</i> de los diferentes ensayos de desinfección de semillas de <i>N. parviflora</i> .	44
Figura 12. Germinación <i>in vitro</i> de <i>N. parviflora</i> empleando diferentes tiempos de escarificación con ácido sulfúrico.	45

Figura 13. Germinación acumulada <i>in vitro</i> de semillas de <i>Nolina parviflora</i> expuestas 24 horas en H ₂ O ₂ y posteriormente escarificadas con ácido sulfúrico 10 segundos previo al tren de desinfección.	46
Figura 14. Plántulas de <i>N. parviflora</i> germinadas <i>in vitro</i> .	48
Figura 15. Explantes de hoja a los cinco y 15 días de cultivo.	49
Figura 16. Explantes de tallo de <i>N. parviflora</i> en el tratamiento control continuando su desarrollo normal.	50
Figura 17. Formación de hojas en explante de tallo de <i>N. parviflora</i> de tres y cuatro meses de edad en BA 2 mg L ⁻¹ .	50
Figura 18. Desarrollo de brotes adventicios a partir de explantes de tallo de cinco meses de edad en BA 5 mg L ⁻¹ a los 13 y 48 dds.	51
Tabla 5. Número de hojas y brotes promedio de <i>N. parviflora</i> desarrollados en explantes de diferentes edades expuestos a tratamientos con BA 48 días después de la siembra.	51
	64
Figura 19. Formación de hojas aisladas no dispuestas en roseta en explantes de tallo de cinco meses de edad después de 12 semanas en BA 3 mgL ⁻¹ y 5 mgL ⁻¹ .	
Figura 20. Desarrollo de brotes de tallo de <i>N. parviflora</i> a las dos y tres semanas.	54
Figura 21. Desarrollo de brotes de tallo de <i>N. parviflora</i> a las cuatro y cinco semanas.	55
Figura 22. Formación de brotes de <i>N. parviflora</i> en explantes de tallo de cinco meses de edad, en BA 3 mgL ⁻¹ y 5 mgL ⁻¹ después de cuatro semanas.	55
Figura 23. Formación de brotes de <i>N. parviflora</i> en explantes de tallo de cinco meses de edad, en BA 3 mgL ⁻¹ y 5 mgL ⁻¹ después de 12 semanas.	56
Figura 24. Formación de callo en explantes de tallo de <i>N. parviflora</i> en BA 5 mgL ⁻¹ nueve semanas después de la siembra.	58
Figura 25. Obtención de raíces en medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa después de ocho semanas.	59
Figura 26. Porcentaje de brotes enraizados de <i>N. parviflora</i> provenientes de los tratamientos con BA 3 y 5 mgL ⁻¹ en dos medios de cultivo.	59

RESUMEN

Nolina parviflora es endémica de México, se distribuye en la Ciudad de México y los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Zacatecas. Los ambientes en que se desarrolla la especie determinan que haya baja supervivencia de las plántulas ya que están expuestas a periodos prolongados de sequía y la ocurrencia frecuente de temperaturas bajas extremas. El primer evento reproductivo de la planta se lleva a cabo aproximadamente a los 68 años; de las plántulas que nacen sólo el 39% logra sobrevivir. El presente trabajo propone la propagación *in vitro* como una estrategia para su conservación. Semillas de *N. parviflora* fueron germinadas en medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa; el máximo porcentaje de germinación (98%) se obtuvo a los 31 días posteriores a la siembra. Explantes longitudinales de tallo y de hoja de 1 cm de longitud, obtenidos de plantas de dos, tres, cuatro y cinco meses de edad, fueron sembrados en medio MS adicionado con la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) en concentraciones de 0, 2, 3 y 5 mgL⁻¹. La mejor respuesta morfogénica se observó en BA 3 y 5 mgL⁻¹ en explantes de tallos de cinco meses de edad. Con base en estos resultados se sembraron 280 explantes de tallo distribuidos en ambas concentraciones. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con BA 3 mgL⁻¹ (5.7 brotes/explante) y con BA 5 mgL⁻¹ (5.6 brotes/explante), la morfología de los brotes indicó los mismos resultados. Después de ocho semanas en medio MS al 50% + CA 1gL⁻¹ se obtuvo el 66.3% de brotes enraizados. Por lo tanto, se corroboró la propagación *in vitro* como una estrategia para conservar la especie.

INTRODUCCIÓN

En México, la familia Nolinaceae está bien representada debido a que posee un gran número de especies (49) que representan el 89% de la riqueza mundial, de las cuales, 32 son endémicas. A pesar de su importancia y de la gran cantidad de especies existentes en México, solo una especie es protegida por la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) y 16 especies son mencionadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Golubov *et al.*, 2007; SEMARNAT, 2010).

La familia Nolinaceae tiene una gran importancia económica, por ejemplo algunos géneros como *Dasyllirion* son utilizados para fabricar harinas y un licor llamado “sotol”; con las hojas se realizan artesanías en forma de flor llamados “chimales”, también se realizan cestas; los escapos son utilizados como bordones y las plantas son utilizadas como ornamento en camellones y jardines (Reyes-Valdés *et al.*, 2012; Reyes-Valdés *et al.*, 2013). Una de las especies más famosas de esta familia por su valor ornamental es *Beaucarnea recurvata* conocida como pata de elefante, esta especie se encuentra amenazada debido al tráfico ilegal de la planta y sus componentes como semillas y frutos (Contreras *et al.*, 2008).

El género *Nolina* está representado en México por 20 especies, de las cuales, 11 son endémicas. Este género es utilizado en el estado de Coahuila como una fuente importante de recursos para la elaboración de escobas, cepillos, discos para barredoras mecánicas y cartuchos de explosivos (Sánchez, 1981; Castillo-Quiroz y Cano-Pineda, 2005; Golubov *et al.*, 2007).

Entre los problemas que enfrenta la familia Nolinaceae se encuentran la destrucción de los hábitats causados por actividad antropogénica como la expansión agrícola, la expansión de áreas urbanas y rurales, la creación de nuevas vías de comunicación y la colecta excesiva. Después de la segunda guerra mundial surgió un fuerte interés entre europeos, japoneses y estadounidenses por la colección de plantas suculentas. Afortunadamente muchas nolináceas son de talla grande lo que impide su transporte a excepción de la pata de elefante (*Beaucarnea sp.*) que es extraída por su valor ornamental (Golubov *et al.*, 2007).

Además de estos problemas, las plántulas de *Nolina parviflora* están expuestas a la interacción de periodos prolongados de sequía y la ocurrencia frecuente de temperaturas bajas extremas lo que causa altas tasas de mortalidad (López, 1986), por este motivo es necesario desarrollar estrategias para su conservación y propagación. Una alternativa es utilizar la micropropagación por medio de las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), que hace posible obtener altas tasas de multiplicación a partir de material vegetal sembrado en condiciones asépticas, y controladas (medios químicamente definidos y a temperaturas e intensidad luminosa establecidas) (George *et al.*, 2008). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue promover la micropropagación de *Nolina parviflora* evaluando el efecto de diferentes concentraciones de la citocinina bencilaminopurina (BA) en función de la edad del explante procedente de plántulas germinadas *in vitro*.

ANTECEDENTES

Familia Nolinaceae

La familia Nolinaceae se compone de los géneros *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyliirion* y *Nolina*, consta de 55 especies de las cuales 49 se encuentran en México y 32 de éstas son endémicas. Se distribuye en zonas áridas y semiáridas desde el sur de Estados Unidos a Centroamérica (Solano y Rivera-Lugo, 2012; Arizona-Sonora Desert Museum, 2016). Es una familia de monocotiledóneas compuesta por plantas perennes y dioicas, las hojas tienen un crecimiento arrosetado y pueden ser dentadas o aserradas en el margen, son arborescentes o acaules, es decir, que presentan el tallo tan corto que parecen carecer de él. En algunas especies, el tallo aumenta de volumen en la base debido al almacenamiento de agua y nutrientes como estrategia de supervivencia en los ambientes áridos en los que crecen (Fig. 1) (Arias-Toledo *et al.*, 2000).

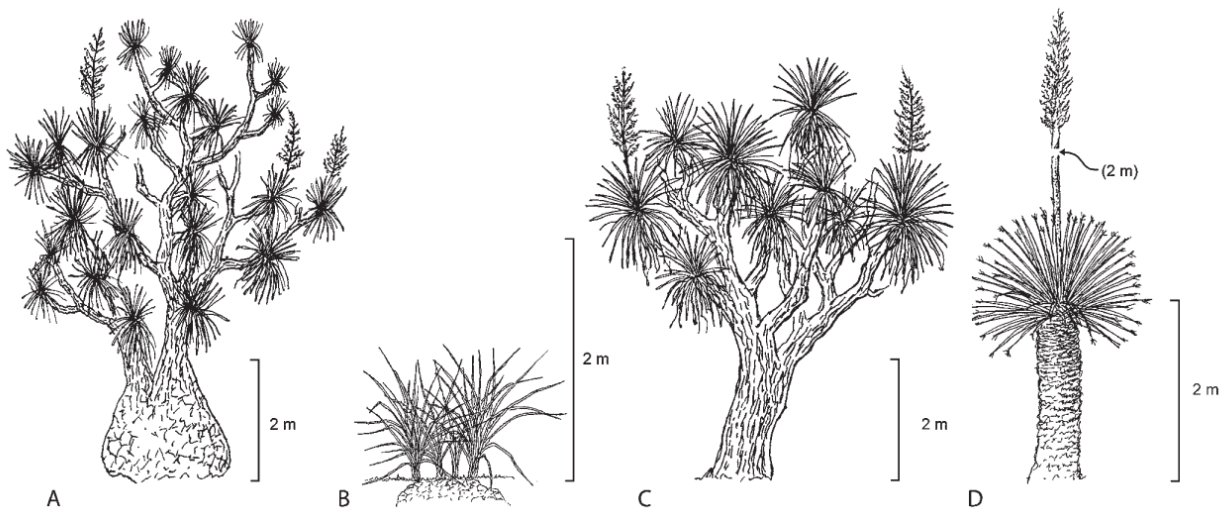


Figura 1. Anatomía del tallo de **A)** *Beaucarnea*, **B)** *Calibanus*, **C)** *Nolina* y **D)** *Dasyliirion*. (Tomado de Rojas-Piña *et al.*, 2012).

La inflorescencia emerge del centro de la roseta, las flores pueden ser blanquecinas o con matices violeta (Fig. 2).

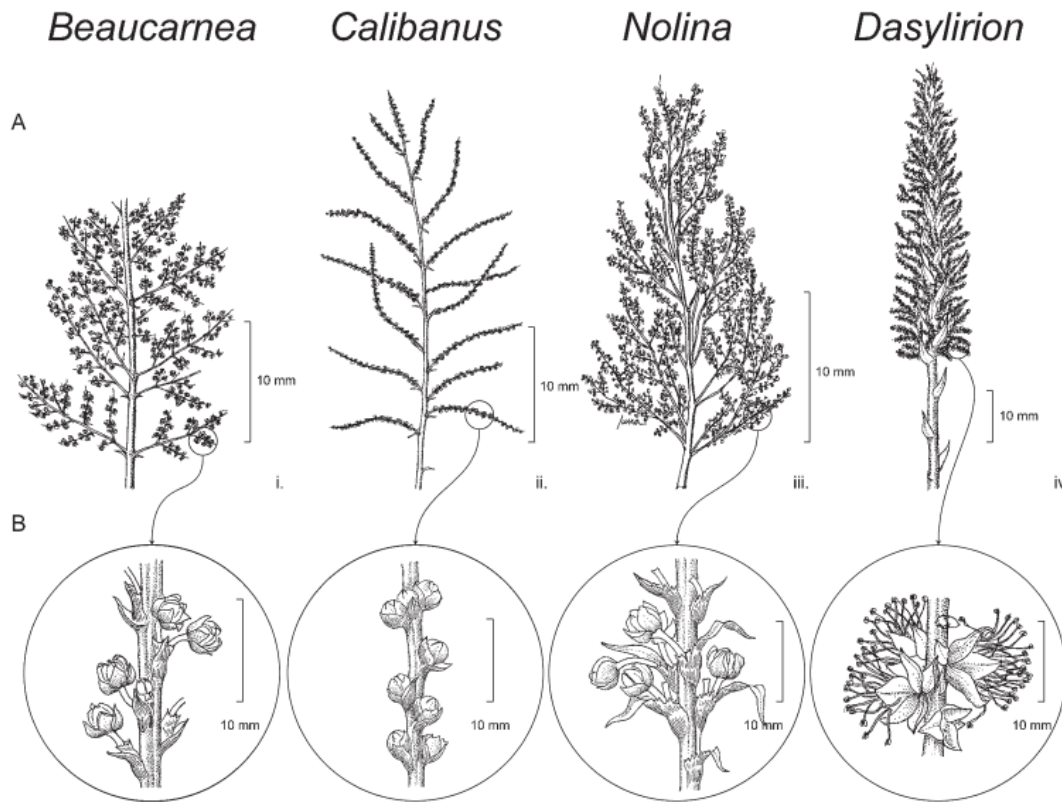


Figura 2. Inflorescencia representativa de *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Nolina* y *Dasylirion*. **A)** Morfología general de la inflorescencia, **B)** Detalle de la porción floral de la inflorescencia (Tomado de Rojas-Piña *et al.*, 2012).

Nolina y los demás géneros también se han ubicado dentro de la subfamilia Nolinoideae dentro de Asparagaceae (APG III, 2009). Sin embargo, Kim *et al.* (2010) consideran que la propuesta del APG III, requiere incluir un mayor número de géneros y tribus para entender claramente las relaciones filogenéticas de la subfamilia Nolinoideae (Asparagaceae) hasta no tener evidencias morfológicas más concretas (Solano y Rivera-Lugo, 2012).

Esta familia desde el siglo pasado ha tenido una gran importancia económica, por ejemplo, las hojas de los géneros *Dasylirion*, *Nolina* y *Beaucarnea* se utilizan en la construcción de techados, la elaboración de cestería, sombreros y materiales similares en los que se requiere trenzar las fibras como lazos y cuerdas (Trelease, 1911), el género *Beaucarnea*

actualmente es muy utilizado como planta ornamental debido a su forma característica que le da el nombre común de “Pata de elefante” (Contreras *et al.*, 2008).

Se ha encontrado evidencia de que los sotoles (*Dasyilirion*) fueron fuente de alimento para los primeros pobladores de Chihuahua, Coahuila, Texas y Nuevo México, también se cree que las semillas eran utilizadas para hacer harinas y como alimento para las aves domésticas debido a su similitud con los mijos y sorgos actuales. Las hojas son utilizadas para la fabricación de cestas y su base es utilizada para artesanías ornamentales conocidas como “chimales” (Fig. 3). Las flores son guisadas y combinadas con otros alimentos. Al cocer y mezclar con agua el tallo de estas plantas se obtiene una bebidas alcohólica llamada sotol. La técnica tradicional fue perfeccionada después de la llegada de los españoles con la técnica del destilado (Reyes-Valdés *et al.*, 2013; Sierra-Tristán y Melgoza-Castillo, 2014). Actualmente la producción de esta bebida alcohólica es muy importante económicamente en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango, en el 2002 el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó la denominación de origen a estos estados (IMPI, 2002).



Figura 3. “Chimal”, flor artificial hecha con hojas de sotol (*Dasyilirion sp.*)(Tomado de Reyes-Valdés *et al.*, 2013).

Muchas poblaciones de nolináceas se encuentran en estado crítico por la continua fragmentación y destrucción de su hábitat ocasionada por la expansión de la agricultura y ganadería así como la extracción de leña, madera y crecimiento urbano. Además del uso no sustentable que se les da a algunas especies, con el tiempo el recurso es sobreexplotado reduciendo las poblaciones (Golubov *et al.*, 2007). En el caso de *Beaucarnea* se extraen semillas, plántulas e individuos juveniles y adultos que afectan el tamaño de la población y la proporción de los sexos, disminuyendo la posibilidad de fertilización y producción de semillas. Este proceso expone a las especies a una posible extinción y al deterioro de la diversidad genética de las mismas (Contreras *et al.*, 2008).

Género *Nolina*

El género *Nolina* es de origen americano, con alrededor de 20 especies de las cuales 11 son endémicas de México (Golubov *et al.*, 2007); se encuentra en el sur y suroeste de Estados Unidos y en México. Las especies del género *Nolina* han sido tratadas como pertenecientes a *Beaucarnea* basándose en caracteres vegetativos, entre ellos el hábito arborescente, disposición de las hojas en rosetas apicales y hojas lineares. Trelease (1911) en su revisión propuso tratar a *Nolina* como un género separado de *Beaucarnea* y *Dasylyrion*, basándose en caracteres vegetativos y reproductivos (Anexo I).

De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, el género *Nolina* se desarrolla de forma natural en climas BS1 kw, que se caracteriza por ser el menos seco de los climas semiáridos, siendo templado con verano cálido (García, 1981). El género es considerado endémico de la flora de los matorrales xerófilos y de los pastizales mexicanos, debido a esto el altiplano mexicano es considerado el centro de dispersión del género (Trelease, 1911).

Este género tiene una amplia gama de utilización como fuente adyacente de recursos para las familias de zonas áridas y semiáridas, ya que lo utilizan para fabricar escobas de paja, canastos y para el techado de casas, como *N. microcarpa* (palmilla o hierba del oso). También sirve como fuente de alimento para ganado (*N. texana*), aunque no de forma relevante, puesto que el ganado sólo consume la parte tierna de la planta y cuando está asociada a las gramíneas (Cruse, 1949). De las hojas se obtiene papel duro, tejidos diversos y además son medicinales por sus sapogeninas y estereoides (Wall y Fenske, 1961;



Figura 4. Ejemplar adulto de *Nolina parviflora* en floración, el color oscuro del tronco y la escasez de las hojas se deben a un incendio en la zona. Fotografía M. Cristina Mendoza Estrada.

Hernández-Xolocotzi, 1987), mientras que otras partes de la planta, como el interior de los troncos, se emplean como alimento (Galván, 2001).

Algunas especies como el cortadillo (*N. cespitifera*) son un recurso forestal no maderable de gran importancia económica para los poblados de las regiones áridas y semiáridas de Coahuila, esta planta representa en la mayoría de los casos la principal fuente de recursos y tiene un gran potencial industrial para el noreste del país, ya que de ésta se obtiene una fibra dura de alta resistencia que mezclada con sorgo escobero es empleada en la fabricación de escobas, cepillos y muebles rústicos en sustitución del ratán. El

aprovechamiento de este recurso es ejecutado por aproximadamente 3 000 familias campesinas (Martínez y Castillo, 2007).

A pesar de la importancia económica que lleva a sobreexplotar las poblaciones de este género, solo dos especies se encuentran protegidas por la NOM-059-SEMARNAT-2010, estas son: *N. cismontana* y *N. interrata*.

Nolina parviflora

Nolina parviflora (Fig. 4) es una planta arborescente de 2.5 a 5 m de altura, ramificada o de tallo simple, hojas planas y flexibles, presenta flores blancas en ocasiones con el perianto violáceo en una inflorescencia al final de un escapo rodeado de brácteas. Es perenne, de afinidad xerófila y el tronco es muy leñoso (Shreve y Wiggings, 1964; Galván, 2001). Crece en matorrales, bosques de encino, pino-encino y pino.

Poseen tallos erectos de 10 a 20 cm diámetro con 1 a 6 ramas. Hojas de 150 a 200 por roseta, inflorescencias paniculadas erectas, flores unisexuales, semillas de 3 a 4mm de largo

y de 3 a 3.5 mm de ancho, elipsoidales a ovoidales, reticuladas a punctiformes, pardas (Anexo II). Su hábitat es en bosques de *Quercus*, *Pinus-Quercus* y bosque tropical caducifolio, sobre laderas de montañas y barrancas, en suelos rocosos y arenosos. En elevaciones de 1800-2700 m.s.n.m. Florece de febrero a mayo y fructifica de abril a noviembre (Galván, 2001).

La especie *Nolina parviflora* es endémica de México (Fig. 5), se distribuye en la Ciudad de México y en los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Zacatecas (Solano y Rivera-Lugo, 2012) con extensiones hacia áreas adyacentes de Oaxaca, estando a veces acompañada de *Yucca periculosa* y *Beaucarnea gracilis*, principalmente sobre laderas de roca volcánica en los alrededores de Perote, Veracruz; Alchichica y Libres, Puebla, asociada en el estrato arbustivo inferior con *Agave obscura*, especies de *Salvia*, *Chrysactinia* y *Dalea* (Hernández-Xolocotzi, 1987; Martínez, 1987).

Debido a la competencia que existe en estos ambientes el desarrollo y establecimiento de plántulas es bajo, además presenta un lento desarrollo sexual ya que la primera reproducción de la planta se lleva a cabo aproximadamente a los 68 años en promedio y de las plántulas que nacen, sólo 39% logra sobrevivir (López, 1986).

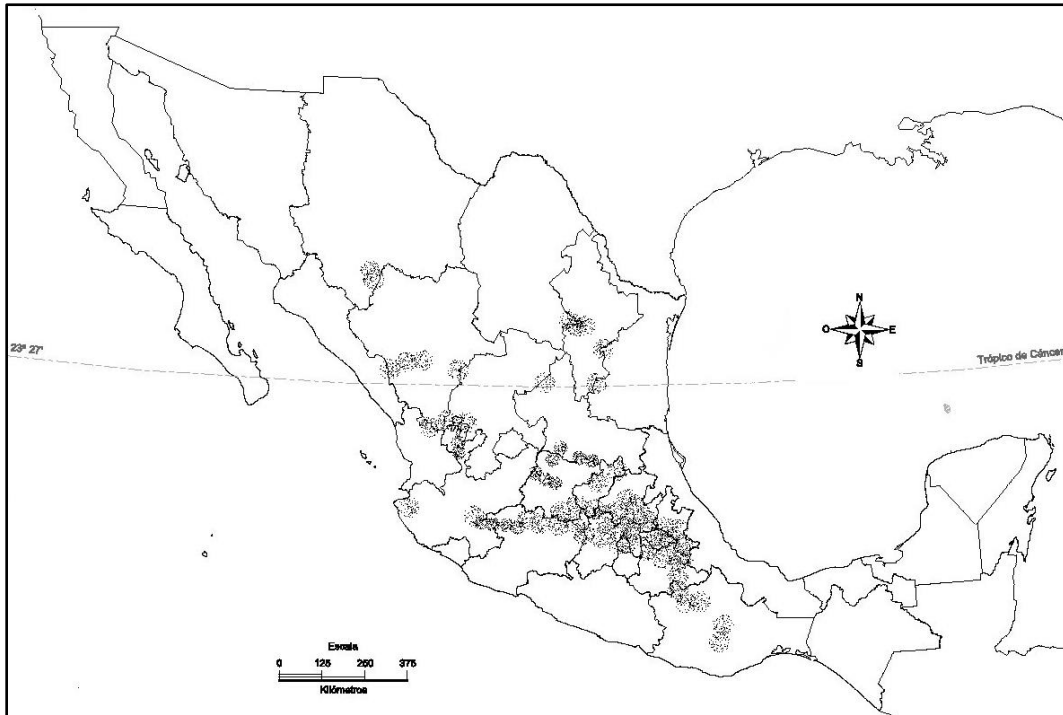


Figura 5. Distribución de *Nolina parviflora* (Modificado de Álvarez, 2015).

Sierra de Santa Catarina

La distribución de *Nolina parviflora* dentro de la Ciudad de México se ubica en el cerro de Guadalupe en la Sierra de Santa Catarina.

La Sierra de Santa Catarina forma parte de la faja Neovolcánica Transmexicana que se encuentra localizada al oriente de la Ciudad de México en los límites de las delegaciones Iztapalapa y Tláhuac; ocupa una extensión aproximada de 2166 ha, de las cuales, el 34% fue declarada Área Natural Protegida el 3 de noviembre de 1994. Es una estructura volcánica relativamente joven con edad de aproximadamente 20000 años, perteneciente al pleistoceno tardío (Lugo-Hubp *et al.*, 1994). Esta sierra está conformada por un conjunto de siete conos volcánicos con un intervalo altitudinal que van entre 2375 y 2740 m: Yuhualixqui o San Nicolás, Xaltepec, Tetecón, Mazatepec, Tecuatzi, Guadalupe o Santa Catarina y La Caldera (este último relieve se encuentra en el Estado de México) (Fig. 6) (Ramírez y Rodríguez, 2002; PMANP, 2005).

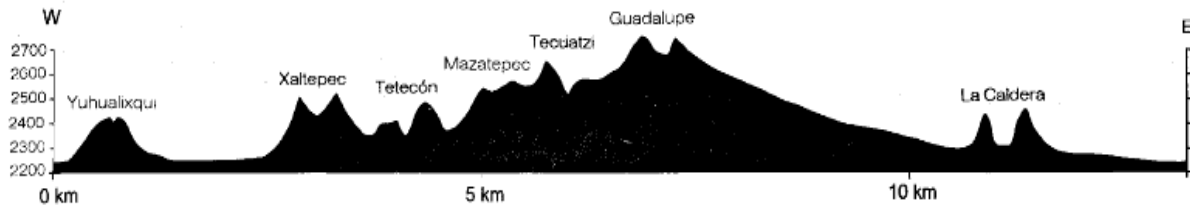


Figura 6. Perfil longitudinal de la Sierra de Santa Catarina (Lugo-Hubpet *al.*, 1994).

Esta sierra marca la división entre dos delegaciones políticas de la Ciudad de México; al sur Tláhuac, y al norte Iztapalapa; también limita al norte con el Estado de México. Igualmente constituye la división de los antiguos lagos de Texcoco (norte) y el de Chalco (sur). Las propiedades de los suelos de la sierra hacen posible la explotación de materiales, la recarga de acuíferos, el uso forestal y, en el caso de los suelos feozem, la actividad agrícola (Ramírez y Rodríguez, 2002; PMANP, 2005).

El clima es templado húmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual oscila entre los 13 y los 19 °C, siendo mayo el mes más cálido y de noviembre a febrero los meses más fríos registrándose hasta -7 °C en enero. La precipitación media anual varía de los 480 a los 607 mm y presenta una evaporación anual de 1667.3 mm. Durante la época de lluvias, se presentan ríos intermitentes y canales, algunos compuestos de los conos volcánicos como la tefra y los derrames lávicos permiten la infiltración de hasta el 50% de la precipitación (PMANP, 2005).

Se distinguen dos tipos de vegetación: 1) el matorral, que se desarrolla en las porciones más secas del Área Natural Protegida y agrupa comunidades arbustivas, en ocasiones acompañadas por árboles bajos y dispersos, dominan la siempreviva (*Sedum praealtum*), nolina (*Nolina parviflora*), palo loco (*Pittocaulon praecox*), tepozán (*Buddleia cordata* y *B. parviflora*), nopal chamacuero (*Opuntia tomentosa*) y el huizache (*Acacia farnesiana*). 2) el pastizal, que se localiza en zonas más bajas, en la zona sur de la sierra, no presenta una composición florística constante, predominan especies de pastos anuales como *Aristida adscensionis* y *Bouteloua simplex*, a menudo con ejemplares de pirul (*Schinus molle*); en algunos sitios se mezcla con arbustos propios del matorral xerófilo (PMANP, 2005).

Cerca del 86% de la superficie vegetal de la sierra ha sido afectada por la apertura de terrenos dedicados a la agricultura y el aclareo de terreno para asentamientos humanos. Se calcula que solo el 14% del área está cubierto por vegetación nativa, esto debido a los trabajos de reforestación que se realizaron entre 1995 y 2001, en los cuales se introdujeron especies inadecuadas como cedro, pino y eucalipto. La reforestación con especies no nativas provoca el desplazamiento de los estratos herbáceos y arbustivos nativos, lo que provoca erosión del suelo, la pérdida de las características naturales del área y la modificación de las interacciones en el ecosistema. Entre otros problemas que presenta la Sierra de Santa Catarina se encuentran los tiraderos clandestinos de basura, los incendios provocados, los asentamientos humanos irregulares y la destrucción de los conos volcánicos para extracción de material de construcción. Cualquier acción de restauración y recuperación de vegetación deberá considerar la utilización de especies nativas (Lugo-Hubpet *al.*, 1994; PMANP, 2005).

Tipos de conservación

La conservación de especies de flora y fauna se lleva a cabo de dos formas tomando en cuenta el sitio en el que se realiza: dentro del hábitat natural o conservación *in situ* y fuera del mismo, es decir, conservación *ex situ*.

La conservación *in situ* se realiza en las áreas en las que las especies crecen naturalmente, procurando mantener la diversidad de los organismos vivos, sus hábitats y las relaciones con su ambiente (Rivas, 2000; Iriondo, 2001). Las instancias en las cuales se puede realizar este tipo de conservación son las Áreas Naturales Protegidas (ANP), los Corredores Biológicos y las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAs) (CONANP, 2016).

La conservación *ex situ* es la aplicación de una gran variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyen a la recuperación y sobrevivencia de los individuos o poblaciones fuera de su hábitat, lo que permite realizar investigaciones sobre la biología o el comportamiento de la especie, para que sea exitosa y completa es necesaria la reintroducción o liberación de ejemplares a la vida silvestre. Los esfuerzos por conservar la biodiversidad vegetal *ex situ* han sido los siguientes: jardines botánicos, los recursos

genéticos forestales (semilleros, plantaciones y bancos de semillas) y recientemente los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales o CTV (Lascuráin *et al.*, 2009; Reed, 2011).

Con el CTV es posible, junto con las acciones tomadas *in situ*, contribuir significativamente a la conservación de especies, mediante la propagación masiva de individuos de interés comercial, que satisfaga la demanda de mercado, reduciendo así la presión de colecta de individuos en las poblaciones naturales, que aunado con técnicas genéticas y ecológicas pueden ayudar a la reintroducción de individuos a sus hábitats originales como es el caso de los agaves y algunas cactáceas (Lascuráin *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2011).

Cultivo de tejidos vegetales

De acuerdo con Cervantes *et al.* (1997), la propagación vegetativa tiene tres variantes: la primera por partes vegetativas, la segunda por injertos donde segmentos de una planta se adhieren a otra receptiva más resistente o de mejores características, la tercera es *in vitro*, en la cual células o pequeñas partes de tejidos u órganos son cultivados en condiciones controladas de laboratorio.

Se le llama Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el cultivo aséptico *in vitro* de cualquier parte de una planta (protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas) en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, humedad relativa, pH y reguladores de crecimiento) para formar plantas completas. Al modificar las condiciones del cultivo o el tipo de explante es posible dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células para realizar investigación básica, la micropropagación de especies de interés económico, obtener plantas libres de patógenos, mejora genética, producción de metabolitos secundarios y producción de semillas artificiales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; Thorpe, 2007; López y Olguín, 2013).

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt al cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Pérez-Ponce, 1998; Thorpe, 2007).

El CTV se basa en tres principios básicos, de cuya manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier proyecto, que son de acuerdo a Pérez-Molphe *et al.* (1999):

1. La selección del explante: se le llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Este puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores, entre otros.
2. Selección del medio y condiciones de cultivo: el medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo, por lo cual su elección y adecuada formulación son aspectos fundamentales para el éxito del CTV.
3. Condiciones asépticas: debido a la riqueza de los medios de cultivo utilizados en el CTV es necesario establecer condiciones asépticas. Por lo que es necesario esterilizar el medio de cultivo y desinfectar el material vegetal.

La regeneración *in vitro* de plantas puede llevarse a cabo por organogénesis, proliferación de yemas axilares, yemas adventicias y embriogénesis somática. La organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema que se desarrollará en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido parental. A estos brotes vegetativos posteriormente se les estimula el desarrollo de las raíces. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de proliferación de células indiferenciadas y de crecimiento desorganizado llamados callos (Fig. 7). La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

En la proliferación de yemas axilares se forman brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas o primordios de las hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente. Este método es el más utilizado debido a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies, y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas. La proliferación de yemas adventicias es la formación *de novo* de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejido meristemático, las cuales se originan de una o un pequeño grupo de células cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citocininas. Con esta técnica es posible producir una mayor

Fitorreguladores

Dentro de los factores internos que controlan el desarrollo de tejidos vegetales se encuentran los fitorreguladores (fitohormonas, hormonas vegetales o reguladores de crecimiento). Los fitorreguladores clásicos son moléculas pequeñas de composición diversa, sintetizadas por la planta que en bajas concentraciones participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de ésta (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; Osuna *et al.*, 2013).

Poseen características que las diferencian de las hormonas animales: a) participan en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleiotrópica, b) diferentes fitorreguladores pueden inducir una misma respuesta, c) causan inhibición en altas concentraciones, d) son sintetizadas y actúan *in situ* o *ex situ* en diferentes órganos y tejidos en periodos específicos del desarrollo, y e) la respuesta depende de la sensibilidad del tejido (Aguilar *et al.*, 2010; Osuna *et al.*, 2013).

Los fitorreguladores han sido clasificados en varios grupos de acuerdo con su estructura y función fisiológica. Estos comprenden a las auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas, etileno, jasmonatos, ácido salicílico, brasinoesteroides, poliaminas, sisteminas y oligosacarinas (Osuna *et al.*, 2013).

Estos reguladores de crecimiento tienen gran importancia en la agricultura y además en el cultivo de tejidos vegetales, ya que, mediante el manejo de las concentraciones y las combinaciones de éstos en un medio de cultivo, se pueden manipular hasta cierto punto los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener la respuesta esperada como la formación de brotes, embriones somáticos, raíces o callo (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Auxinas

Las auxinas fueron los primeros fitorreguladores descritos gracias a las investigaciones hechas por Charles Darwin y su hijo Francis. Ellos trabajaron con plántulas de alpiste (*Phalaris canasriensis*) y de Avena (*Avena sativa*) y realizaron las primeras observaciones sistemáticas referentes a la curvatura hacia la luz (fototropismo) (García *et al.*, 2006).

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptófano, sintetizados por lo general en tejidos en rápido crecimiento por división celular, especialmente en los brotes (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; Osuna *et al.*, 2013). El ácido indol-3-acético (AIA) es la forma predominante; sin embargo existen otras auxinas indólicas naturales. Se encuentran en altas concentraciones en regiones de crecimiento activo. El transporte de las auxinas es polar e independiente de la gravedad (Osuna *et al.*, 2013).

Actualmente se conocen y utilizan varios compuestos sintéticos que tienen actividad de auxinas, como los ácidos fenoxiacéticos (utilizados como herbicidas en altas concentraciones). Algunos ejemplos de auxinas artificiales son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Citocininas

Después del descubrimiento de la auxina, la búsqueda de más fitorreguladores se concentró en hallar aquellos que regularan la división celular. En 1955 Miller *et al.* obtuvieron por tratamiento térmico de ADN un compuesto, el 6-furfurilamino purina, que promovía la división celular. Llamaron a esta sustancia “kinetina” y a los reguladores que se incluían dentro de este grupo “citocininas”, debido a su implicación en los procesos de citocinesis o división celular (García *et al.*, 2006).

La citocininas participan en procesos como la germinación, senescencia y modulan procesos como la fotosíntesis y la respiración (Osuna *et al.*, 2013). Las citocininas generalmente son derivados de la adenina y son más abundantes en semillas, frutos jóvenes en desarrollo y hojas con división activa, así como en los extremos de la raíz (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; Osuna *et al.*, 2013).

En cultivo de tejidos vegetales estimulan la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Las citocininas sintéticas benciladenina (BA) y kinetina son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Ácido abscísico

En 1949 se descubrió que las yemas aletargadas del fresno (*Fraxinus excelsior*) y la papa (*Solanum tuberosum*) contenían grandes cantidades de inhibidores. Estos inhibidores llegaron a ser conocidos como dorminas. En 1960 varios investigadores notificaron el descubrimiento, en hojas y frutos de sustancias capaces de acelerar la abscisión. Una de ellas fue denominada abscisina. En 1965 se observó que tanto la abscisina como la dormina correspondían a un mismo compuesto. Este compuesto se conoce como ácido abscísico (García *et al.*, 2006).

El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpeno (15 carbonos) que presenta diferentes funciones como la inducción de síntesis de proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant), con lo cual se promueve la tolerancia del embrión a la deshidratación y la acumulación de proteínas de almacenamiento en las hojas promueve su senescencia. Es considerada la hormona del estrés, ya que su síntesis se ve favorecida en condiciones adversas (Aguilar *et al.*, 2010).

Giberelinas

Las giberelinas fueron descubiertas en Japón mientras se estudiaba una enfermedad del arroz que provocaba crecimiento excesivo de los tallos, alargamiento y clorosis de las hojas entre otros síntomas. Estos se debían a la acción del hongo *Gibberella fujikuroi*, y en 1938 se denominó a estos compuestos giberelinas. Las giberelinas regulan la germinación, el crecimiento en longitud del tallo, peciolo y el pedúnculo floral, la floración, el desarrollo floral y la determinación del sexo (Osuna *et al.*, 2013).

Las giberelinas tienen diferentes aplicaciones industriales como son el aumento del tamaño de las uvas sin semilla, la elongación del fruto de las manzanas y en los cítricos se retrasa la senescencia (García *et al.*, 2006).

Micropropagación

La micropropagación forma parte de las aplicaciones que tiene el CTV y se refiere a la multiplicación masiva de plantas genéticamente idénticas a la planta madre, en relativamente poco tiempo y por medio de subcultivos sucesivos hasta su transferencia a suelo con lo que se obtienen plantas con mayor homogeneidad y calidad (López y Olguín, 2013).

La micropropagación se compone de cinco etapas:

Etapla 0: En esta etapa se elige a las plantas que serán fuente de explante, las cuales se mantienen en condiciones de invernadero y se les proporcionan tratamientos con fitorreguladores de manera exógena previos al cultivo (López y Olguín, 2013).

Etapla 1: Establecimiento del cultivo aséptico, en esta etapa el explante seleccionado pasa por una serie de pasos que lo desinfectan superficialmente (López y Olguín, 2013). Para esto se utilizan diferentes compuestos como el hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes concentraciones y el jabón comercial (Kumar y Shiong, 2012). La selección y concentración de estos compuestos se obtiene experimentalmente a través del ensayo y error (Villalobos y Thorpe, 1993).

Etapla 2: Multiplicación, aquí se lleva a cabo la proliferación de brotes capaces de generar nuevas plantas. Esta fase de crecimiento puede deberse a la división celular, al aumento de su tamaño o a ambas cosas (Villalobos y Thorpe, 1993; López y Olguín, 2013).

Etapla 3: Enraizamiento, en esta etapa los brotes obtenidos en la etapa dos son individualizados y transferidos a otro medio con las características necesarias para promover la formación de raíces o pueden ser pasados a suelo para ser enraizados *ex vitro* (López y Olguín, 2013). En muchas especies solo es necesaria la disminución de sales en el medio, pero en otras se requiere de fitohormonas como las auxinas (Villalobos y Thorpe, 1993).

Etapla 4: En esta etapa se lleva a cabo el trasplante y la aclimatización, las plantas salen del ambiente estéril y son transferidas a un sustrato. En esta etapa es necesario extremar cuidados para que las plantas no mueran por la pérdida excesiva de agua o por contaminación, para esto es importante realizar la transferencia de manera gradual y en condiciones ambientales semicontroladas (López y Olguín, 2013).

La micropropagación forma parte de la biotecnología que se ha utilizado mundialmente en especies de interés económico y con fines de conservación (Villavicencio *et al.*, 2007). Estas

técnicas son utilizadas principalmente para especies de interés económico pertenecientes a familias como Solanaceae y Rosaceae , ya sea por su valor nutricional u ornamental, pero también son útiles para la conservación *in vitro* de especies con mecanismos de reproducción insuficientes, como es el caso de especies de la familia Orquidaceae, ciclos de vida muy largos y especies en peligro de extinción (López y Olguín, 2013), además estas técnicas pueden tener ventajas sobre las colecciones de plantas vivas en viveros o jardines botánicos ya que se tiene un control estricto de las condiciones de cultivo y crecimiento (Golubov *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2011).

Cultivo de tejidos en la familia Nolinaceae

Durante muchos años, la obtención de materia prima de estas especies procedió de las poblaciones silvestres, para evitar que estas poblaciones disminuyan se han creado protocolos de producción en vivero, como es el caso de *Nolina cespitifera* (Castillo-Quiroz y Cano-Pineda, 2005). A pesar de estos esfuerzos, ha sido necesario desarrollar técnicas que aceleren la producción. Para establecer un protocolo de propagación *in vitro* adecuado se debe tener una técnica eficiente de desinfección del material que se utilizará para establecer cultivos asépticos, de los cuales se obtendrán explantes para la etapa de inducción. En la familia Nolinaceae para el establecimiento *in vitro* de las semillas se han empleado diferentes tratamientos utilizando sustancias como hipoclorito de sodio (NaClO), etanol (C₂H₅OH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En algunas especies se ha logrado la desinfección completa de las semillas con un solo tratamiento en peróxido de hidrógeno por 24 h como en *Nolina parviflora* o someterse a varios tratamientos con plata, etanol e hipoclorito de sodio y aun así obtener 1% de contaminación en *Dasyllirion cedrosanum* (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de diferentes sustancias empleadas para la desinfección y establecimiento *in vitro* de semillas de algunas especies de la familia Nolinaceae.

Tratamiento	<i>Dasyliirion cedrosanum</i>	<i>Beaucarnea compacta</i> y <i>B. purpusii</i>	<i>B. gracilis</i> y <i>B. recurvata</i>	Varias especies *	<i>Nolina parviflora</i>		
Plata coloidal 0.052%	3 min ¹						
Benomyl 3 gL ⁻¹			20 h ⁴				
H ₂ O ₂ (3 % v/v)					24 h		
H ₂ O ₂ 10 % v/v		10 min ³					
Detergente comercial		30 min ¹	30 min ¹	10 min ¹			
Captan 3%		24 h ²					
Etanol 70% v/v	5 min ²	1 min ⁴	1 min ²	1 min ²		1 min ¹	
NaClO 100% (6% cloro activo) + unas gotas de Tween 20	3 min ³						
NaClO 3% v/v						5 min ²	5 min
NaClO 10% v/v				20 min ³			
NaClO 30% v/v (6% cloro activo) + 2 gotas de Tween 80		30 min ⁵	30 min ³				
Enjuagues con agua destilada estéril antes de la siembra	5 ⁴	3 ⁶	1 ⁵	4 ⁴			
Porcentaje de contaminación	1%	0%	0%	0%	0%	33%	33%
Referencia	Villavicencio <i>et al.</i> , 2007	Vadillo, 2012	Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013	Flores <i>et al.</i> , 2008		

**Beaucarnea goldmanii*, *B. gracilis*, *B. recurvata*, *Dasyliirion leiophyllum*, *D. longissimum*, *D. lucidum*, *D. serratifolium*, *Nolina durangensis*, *N. longifolia* y *N. parviflora*.

#El número en superíndice indica la secuencia de las soluciones empleadas para la desinfección.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

NaClO: Hipoclorito de sodio.

El uso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en algunas especies forestales (pinos) se ha utilizado por la capacidad de desinfección y porque también incrementa el porcentaje de germinación. Ablanda la testa y aumenta la permeabilidad al agua y oxígeno, facilitando la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos en la célula, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas necesarias para la movilización de componentes celulares que están involucrados en el crecimiento de la raíz (Ching, 1959).

Las primeras pruebas de germinación reportadas se realizaron *ex vitro* en *N. cespitifera* por Vázquez (2005) quien probó la escarificación de semillas en agua caliente ($80\text{ }^\circ\text{C}$) durante 12, 24 y 72 horas en ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante 10, 20 y 30 minutos; el mejor resultado se obtuvo remojando las semillas por 24 horas en agua caliente pero no especifica el porcentaje de germinación. Vega-Cruz y colaboradores (2006) también realizaron pruebas de germinación con escarificación física de semillas de *Dasyllirion leiophyllum* y *D. sereke*, frotándolas entre dos lijas, obteniendo 80% de germinación a los 12 días y 0% de germinación en las semillas que no fueron escarificadas (Tabla 2). La germinación *in vitro* se ha realizado en especies del género *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina*.

Los protocolos de propagación se han realizado principalmente en especies como *Beaucarnea* y *Dasyllirion*, debido a su valor ornamental y económico. Como es el caso del trabajo de Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) que reportaron la micropropagación de *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata* en diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA), obteniendo el mayor porcentaje de brotes por explante en concentraciones de 5 mgL^{-1} .

Tabla 2. Porcentajes de germinación *in vitro* de diferentes especies de la familia Nolinaceae.

Especie	Tipo de medio o sustrato	Inicio de germinación (días)	Porcentaje máximo de germinación	Día al que se alcanzó el % máximo de germinación	Referencias
<i>Nolina cespitifera</i>	Agrolita	30	46-50%	N.E.	Castillo-Quiroz y Cano-Pineda, 2005
<i>N. parviflora</i>		18	80%	27	Reyes-Bautista y Rodríguez-Trejo, 2005
<i>B. gracilis</i>	Medio MS + 2 mgL ⁻¹ glicina + 100 mgL ⁻¹ mioinositol + 5.5 gL ⁻¹ de agar	5	89.8%	30	Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005
<i>B. recurvata</i>		5	95.3%	30	
<i>Dasyllirion leiophyllum</i>	Papel filtro con escarificación física previa a la siembra.	4	80%	12	Vega-Cruz <i>et al.</i> , 2006
<i>D. sereke</i>					
<i>D. cedrosanum</i>	Medio MS	7	80%	20	Villavicencio <i>et al.</i> , 2007
<i>Beaucarnea compacta</i>	Medio MS	6	93%	32	Vadillo, 2012
<i>B. purpusii</i>		9	98%	25	
Varias especies*	Medio MS	8	22-96%	28	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013

**Beaucarnea goldmanii*, *B. gracilis*, *B. recurvata*, *Dasyllirion leiophyllum*, *D. longissimum*, *D. lucidum*, *D. serratifolium*, *Nolina durangensis*, *N. longifolia* y *N. parviflora*

En esta misma especie Castañeda y Santacruz en el 2008, probaron diferentes concentraciones de BA, obteniendo 10.9 brotes por explante en 5 mgL⁻¹. También se han probado diversas técnicas como los sistemas de inmersión temporal en medios líquidos en *B. recurvata* utilizando biorreactores de 250 y 1000 mL de capacidad reportando menor número de brotes en aquellos biorreactores de 250 mL (Castañeda-Nova *et al*, 2011).

Reyes-Silva y colaboradores en el 2013 propagaron *in vitro* 10 especies: *Beaucarnea goldmanii*, *B. gracilis*, *B. recurvata*, *Dasyllirion leiophyllum*, *D. longissimum*, *D. lucidum*, *D. serratifolium*, *Nolina durangensis*, *N. longifolia* y *N. parviflora*, utilizando diferentes concentraciones de BA, 2iP, TDZ y MT (Citocininas) las mejores respuestas se reportaron en BA 3 y 4 mgL⁻¹ (Tabla 3). Debido a la importancia de la familia Nolinaceae que incluye géneros de importancia económica y ecológica, las técnicas de CTV se han aplicado como una alternativa para propagación masiva (rápida y eficaz) de ejemplares que puedan ser reintroducidos a su hábitat con fines de reforestación.

Tabla3. Trabajos reportados para la propagación y enraizamiento *in vitro* de diferentes miembros de la familia Nolinaceae.

Especie	Explante	Medio de inducción+ Agar (g ^L ⁻¹)+RC (mgL ⁻¹)	Ruta morfológica	N° de b/e	Respuesta (días)	Medio de enraizamiento	Enraizamiento (%)	Respuesta (días)	Referencia	
<i>Beaucarnea compacta</i>	Tallos	MS + BA (5)	Organogénesis directa	23	30	MS 50% + CA 1 gL ⁻¹	100	45	Vadillo, 2012	
<i>B. purpusii</i>		MS 50% + Agar (0.6 %) + BA (5)		5		MS + CA 0.5 gL ⁻¹ MS + CA 1 gL ⁻¹	90			
<i>B. goldmanii</i>		MS+ Agar (8) + BA (3)	Organogénesis directa	3.9	56-60	MS Agar 8 gL ⁻¹ + CA 2 gL ⁻¹	75	45-50	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013	
<i>B. gracilis</i>		MS+ Agar (8) + BA (4)		9.4			63			
<i>B. recurvata</i>		Tallos	MS + BA (5)	Organogénesis directa	8	30	MS + CA 1 gL ⁻¹	61	30	Osorio-Rosales y Mata-Rosas, 2005
					11			91		
		Yemas axilares	MS + BA (5)	Proliferación de yemas axilares	N.E.	30	MS, Phytigel 2 gL ⁻¹ + AIB 1 mgL ⁻¹	N. E.	30	Castañeda-Nova <i>et al.</i> , 2011
		Tallos	MS+ Agar (8) + BA (3)	Organogénesis directa	9.4	56-60	MS Agar 8 gL ⁻¹ + CA 2 gL ⁻¹	69	45-50	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013
		Yemas axilares	MS+ Agar (8) + BA (5)	Proliferación de yemas axilares	10.9	65	MS, Phytigel 8.2 gL ⁻¹ + AIB 1 mgL ⁻¹	6.6 r/e	45	Castañeda y Santa Cruz, 2008

AIB: Ácido indolbutírico, **BA:**Benciladenina, **b/e:** Brotes por explante, **CA:**Carbón activado, **MT:**Metatopolina, **N.E.:** No especificado, **r/e:** Raíces por explante, **RC:** Regulador de crecimiento, **TDZ:**Tidiazurón.

Tabla 3. Continuación.

Especie	Explante	Medio de inducción+ Agar (gL ⁻¹)+RC (mgL ⁻¹)	Ruta morfogénica	N° de b/e	Respuesta (días)	Medio de enraizamiento	Enraizamiento (%)	Respuesta (días)	Referencia
<i>Dasyliirion cedrosanum</i>	Epicótilo	MS + BA 0.25 y AIB 0.21	Organogénesis directa	7	N.E.	MS + AIB 0.38 mgL ⁻¹	3.4 r/e	42	Villavicencio <i>et al.</i> , 2007
<i>D. leiophyllum</i>	Tallos	MS+ Agar 8 + BA 3	Organogénesis directa	10.3	56-60	MS Agar 8 gL ⁻¹ + CA 2 gL ⁻¹	100	45-50	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>D. longissimum</i>		MS+ Agar 8 + BA 4		2.2			100		
<i>D. lucidum</i>		MS+ Agar 8 + BA 4		6.8			97		
<i>D. serratifolium</i>		MS+ Agar 8 + BA 4		6.9			96		
<i>Nolina duranguensis</i>		MS+ Agar 8 + BA 4		7.8			86		
<i>N. longifolia</i>		MS, Agar 8 + BA 4		7.7			83		

AIB: Ácido indolbutírico, **BA:**Benciladenina, **b/e:** Brotes por explante, **CA:**Carbón activado, **MT:**Metatopolina, **N.E.:** No especificado, **r/e:** Raíces por explante, **RC:** Regulador de crecimiento, **TDZ:**Tidiazurón.

Tabla 3. Continuación.

Especie	Explante	Medio de inducción+ Agar (gL ⁻¹)+RC (mgL ⁻¹)	Ruta morfogénica	N° de b/e	Respuesta (días)	Medio de enraizamiento	Enraizamiento (%)	Respuesta (días)	Referencia
<i>N. recurvata</i>	Yemas apicales de plantas adultas (10 años).	MS 50% + BA y AIB 0.1	Organogénesis directa	6	28	MS + AIB 1 mgL ⁻¹	4.9 r/e	28	Bettaiebet <i>et al.</i> , 2008
<i>N. parviflora</i>	Tallo	MS+ Agar 8 + BA 4	Organogénesis directa	2.9	56-60	MS Agar 8 gL ⁻¹ + CA 2 gL ⁻¹	95	45-50	Reyes-Silva <i>et al.</i> , 2013
	Segmento basal de tallo	MS, Tiamina 3%, Inositol 3%, Ac. Nicotínico 3%, Ac. Piridoxínico 3%, sacarosa 3%, Agar 7%+ 2,4-D 0.22 mgL ⁻¹ + KIN 0.021 mgL ⁻¹	Organogénesis directa (raíz)	25	70	MS, Tiamina 3%, Inositol 3%, Ac. Nicotínico 3%, Ac. Piridoxínico 3%, sacarosa 3%, Agar 7%	N.E.	40	Flores <i>et al.</i> , 2009

AIB: Ácido indolbutírico, **BA:**Benciladenina, **b/e:** Brotes por explante, **CA:**Carbón activado, **MT:**Metatopolina, **N.E.:** No especificado, **r/e:** Raíces por explante, **RC:** Regulador de crecimiento, **TDZ:**Tidiazurón.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Nolina parviflora* es una especie de lento crecimiento que alcanza su madurez sexual después de los 60 años, y al bajo porcentaje de plántulas que logran sobrevivir, se propone el uso del Cultivo de Tejidos Vegetales como una alternativa para su estudio, propagación y conservación.

OBJETIVOS

General

Desarrollar la metodología de propagación *in vitro* para *Nolina parviflora* a partir de explantes de diferentes edades.

Particulares

- Determinar el mejor proceso de desinfección y tiempo de escarificación para obtener el mayor porcentaje de germinación de semillas.
- Evaluar la concentración de BA, el tipo y la edad del explante que promuevan el mayor número de brotes.

METODOLOGÍA

Colecta de material vegetal

Las semillas de *N. parviflora* fueron colectadas el 28 de marzo del 2013 en la parte sur del cráter del cerro de Guadalupe (Fig. 8), pueblo de San Francisco Tlaltenco, Delegación Tláhuac, Ciudad de México. Las semillas fueron colectadas de tres individuos diferentes y se almacenaron por dos semanas, antes de la siembra, en bolsas de papel en condiciones de refrigeración a 5 °C.

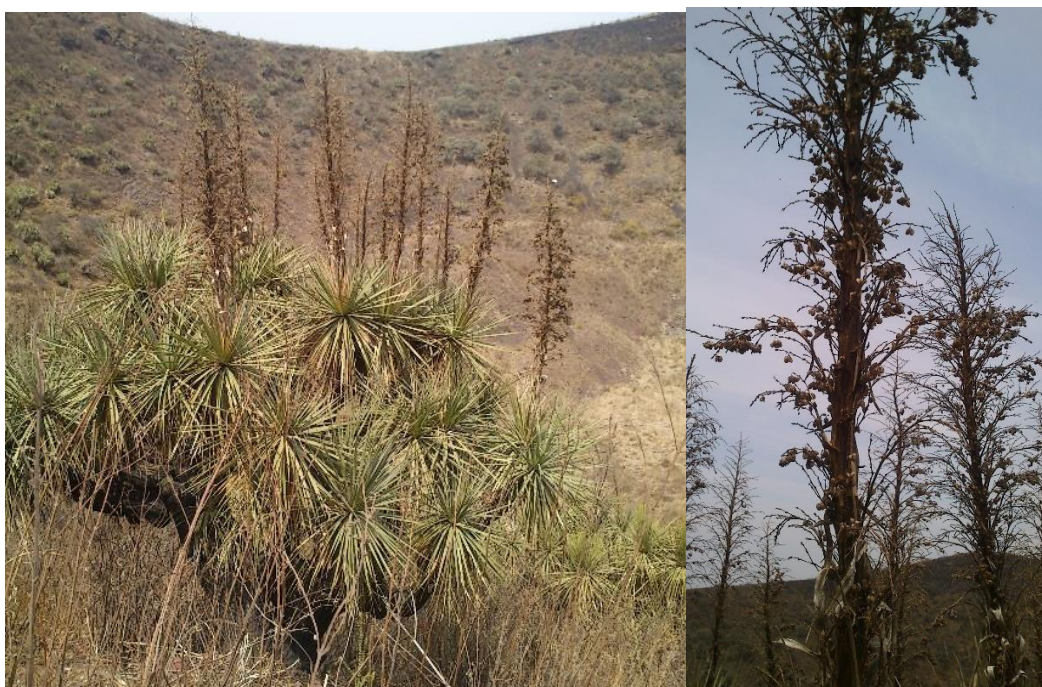


Figura 8. Ejemplar adulto de *Nolina parviflora* en proceso de fructificación (Izq.). Infrutescencia (Der.).

Desinfección superficial y escarificación de semillas

Se realizaron varios ensayos para determinar el mejor tren de desinfección y tiempo de escarificación para obtener el mayor porcentaje de germinación.

Se realizaron cuatro ensayos de desinfección, con 30 semillas cada uno: 1) peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%; 2) agua destilada con 3 gotas de detergente líquido comercial, alcohol 70%, NaClO al 30% (V/V) (6% de cloro activo); 3) peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, agua destilada con 3 gotas de detergente líquido, alcohol 70% y NaClO al 30% y 4) al 40% (v/v 6% de cloro activo). Todos adicionados con 3 gotas de Tween 80 por cada 50 mL

de agua destilada y en agitación constante. Los tiempos empleados en cada una de las soluciones se muestran en la Tabla 4. Al terminar cada uno de los ensayos las semillas fueron enjuagadas tres veces en agua destilada estéril dentro de una campana de flujo laminar. Así mismo para acelerar el inicio de la germinación se realizaron cuatro pruebas de escarificación con ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), utilizando el mejor tratamiento de desinfección (ensayo 4). Se ensayaron cuatro tiempos de escarificación: 10 segundos, 15 segundos, 1 minuto y 2 minutos. Estas pruebas fueron independientes y posteriores a las pruebas de desinfección.

Tabla 4. Diferentes ensayos de desinfección realizados para el establecimiento *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora*.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
H ₂ O ₂ (3 % v/v)	24 h*	-----	24 h*	24 h*
Agua destilada + 3 gotas de detergente líquido Dawn®	-----	3 min	3 min	15 min
Alcohol al 70%	-----	2 min	2 min	2 min
Hipoclorito de sodio al 30%	-----	30 min	30 min	-----
Hipoclorito de sodio al 40%				30 min

*en agitación constante

Siembra de semillas

Las semillas se sembraron en frascos de vidrio (tipo Gerber®) con 25 mL de medio Murashige y Skoog (1962) al 50% de macronutrientes, micronutrientes, sacarosa 15 gL⁻¹, agar bacteriológico Bioxón® 8 gL⁻¹ y pH 5.7-5.8 (Anexo III). El medio fue esterilizado durante 18 minutos en un autoclave a 121 °C y a una presión de 1.5 Kg cm⁻². Se realizaron cuatro siembras simultáneas de 50 semillas cada una y se colocaron 5 semillas por cada frasco con medio. La incubación se realizó en una cámara de ambiente controlado a 26 ± 2 °C, fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad y 30-40 μmol m⁻²s⁻¹ de intensidad luminosa.

La evaluación de la germinación se realizó diariamente. Se obtuvo el promedio de los porcentajes de germinación de las cuatro siembras y a partir de los resultados se generó una curva de germinación acumulada con Excel. Se consideró como criterio de germinación cuando emergió la radícula (Orozco-Segovia y Sánchez-Coronado, 2013).

Inducción de brotes

Ensayo preliminar

Con el fin de realizar una exploración de la respuesta de los explantes a las diferentes concentraciones de BA en relación con su edad. Se utilizaron plántulas germinadas *in vitro* de 5 a 10 cm de longitud con dos, tres, cuatro y cinco meses de edad (Fig. 9A). De cada plántula se obtuvieron tres tipos de explantes: tallo, hoja basal y hoja media. Se sembraron en medio MS adicionado con tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BA) más el tratamiento control: 0, 2, 3 y 5 mgL⁻¹. Para cada tipo de explante (tallo, hoja media y hoja basal) se aplicaron 16 tratamientos de la combinación de las cuatro concentraciones de BA y las cuatro edades. En cada tratamiento se sembraron tres explantes de cada tipo.

A las plántulas se les eliminó la raíz (Fig. 9B) y el cotiledón (Fig. 9C), las hojas fueron separadas del tallo con la ayuda de unas pinzas y cortadas transversalmente en tres partes. El primer centímetro desde la base correspondió al explante de hoja basal, el segundo centímetro, al de hoja media, y el resto de la hoja o parte apical se desechó (Fig. 9D y E). A los explantes de tallo se les retiraron hojas y raíz (Fig. 9F). Los cultivos se incubaron en las mismas condiciones ambientales que las de germinación.

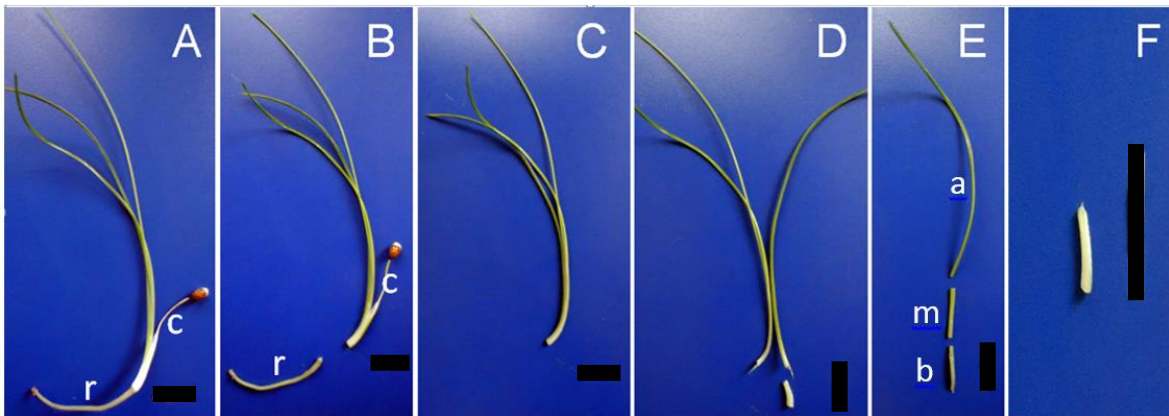


Figura 9. Obtención de explantes de *N. parviflora*. **A.** Plántula germinada *in vitro*. **B.** Eliminación de la raíz (r). **C.** Remoción del cotiledón (c). **D y E.** Se realizaron cortes transversales de hoja para obtener explantes de hoja basal (b) y hoja media (m), el segmento apical (a) se desechó. **F.** Explante de tallo sin hojas. Barra = 1 cm.

Micropropagación

Con base en los mejores resultados obtenidos del ensayo preliminar, se seleccionaron explantes de tallo de plántulas de cinco meses de edad que se sembraron en medio MS adicionado con 3 y 5 mgL⁻¹ de BA (medio de inducción).

El tratamiento control ya no se repitió ya que la respuesta de los explantes fue nula. Para cada concentración de BA se realizaron cuatro repeticiones con cuatro frascos cada una y se colocaron cinco explantes por frasco (20 explantes por tratamiento), dando un total de 80 explantes por cada concentración de BA.

Elongación y enraizamiento

Después de 12 semanas en el medio de inducción, los brotes bien diferenciados se individualizaron separándolos mecánicamente con la ayuda de un bisturí, mientras que los que no estaban bien diferenciados se dejaron unidos al explante inicial. Posteriormente se subcultivaron en medio MS al 50% de macronutrimientos, micronutrimientos y sacarosa (medio de elongación) donde permanecieron ocho semanas. Después las plántulas se colocaron en medio de enraizamiento MS al 50% con carbón activado 1gL⁻¹ durante ocho semanas (Fig. 10).

Análisis estadístico

Para la evaluación de la germinación en los diferentes tratamientos, se llevó a cabo el registro diario de las semillas germinadas. Se obtuvieron los promedios, las medidas de dispersión (error estándar) y se calculó el porcentaje acumulado de germinación.

De los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento se realizó el conteo del número de brotes u hojas por explante, se efectuó una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov). Posteriormente se realizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para determinar si había diferencias significativas en los diferentes tratamientos. Se empleó el programa SPSS Statistics 19 (2013) y la hoja de cálculo de Excel para las gráficas correspondientes.

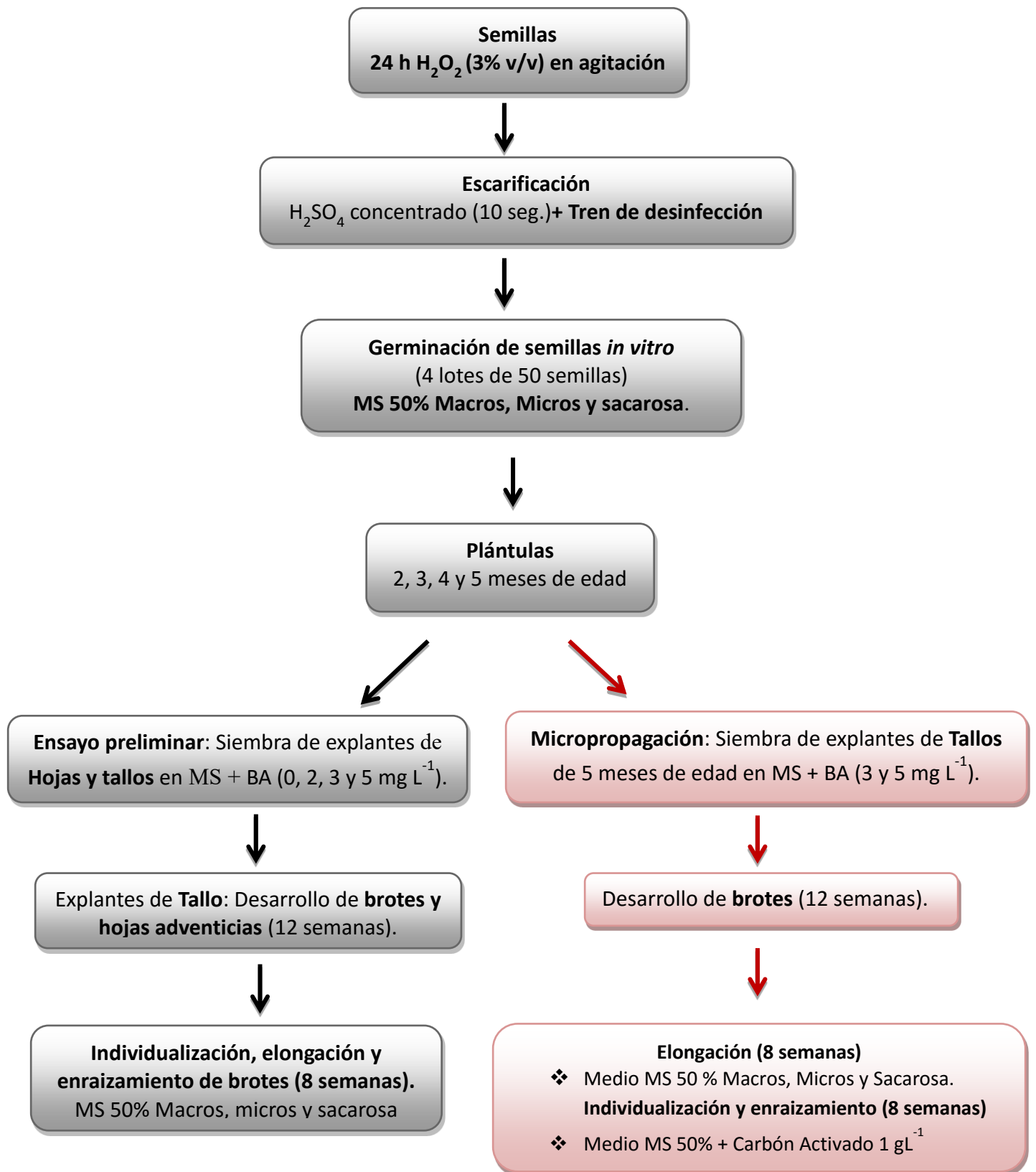


Figura 10. Método general para la propagación de *Nolina parviflora*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección superficial y siembra de semillas

Ensayos de desinfección

De los cuatro ensayos de desinfección aquel en el que no se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (ensayo 2) presentó 100% de contaminación. En los diferentes ensayos realizados, las principales diferencias se observaron en el inicio de la germinación que fueron de 20, 15 y 13 días posteriores a la siembra registrando el mayor porcentaje de germinación (80%, 70%, 100%) a los 41, 43 y 35 días en los ensayos 1, 3 y 4 respectivamente. Siendo el ensayo cuatro el más favorable (Fig. 11).

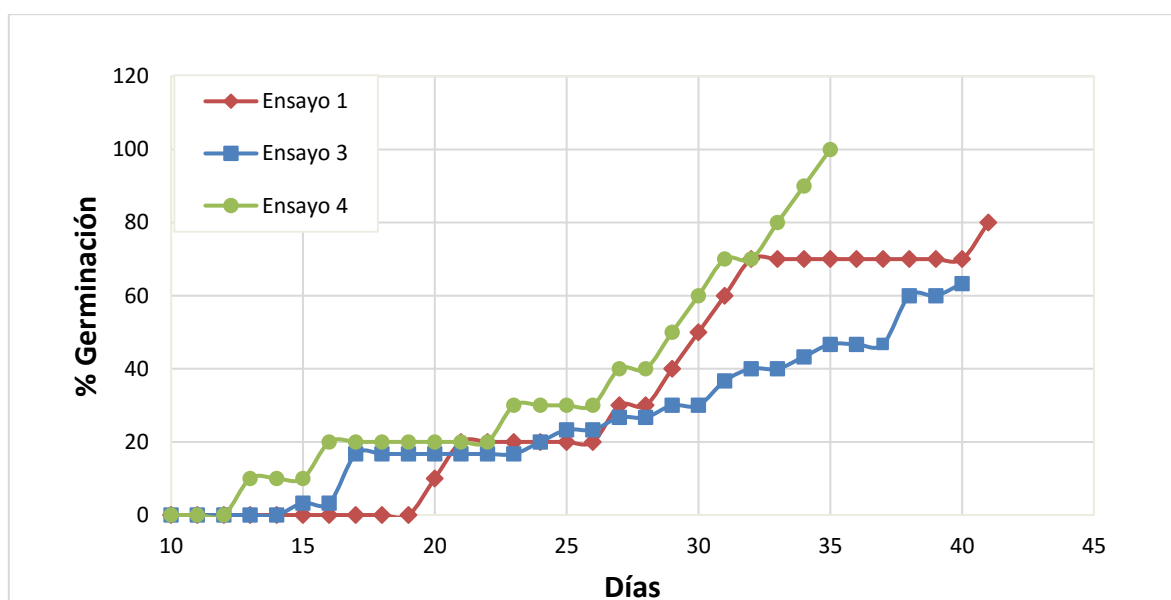


Figura 11. Porcentaje de germinación acumulada *in vitro* de los diferentes ensayos de desinfección de semillas de *N. parviflora*.

En el ensayo dos las semillas fueron sometidas a un tren de desinfección sin peróxido de hidrógeno mostrando 100% de contaminación lo que indicó la importancia de este compuesto en la desinfección de semillas. Flores y colaboradores (2008) colocaron semillas de *N. parviflora* en peróxido de hidrógeno durante 24 horas, lo que dio como resultado cero contaminación, esto es similar a lo obtenido en el presente trabajo.

Este compuesto ha sido utilizado para desinfectar semillas de otras familias como en el caso de diferentes especies del género *Pinus* que, al sumergirlas hasta por cuatro horas, hubo total ausencia de contaminación, pero al aumentar la exposición al peróxido de hidrógeno el porcentaje de germinación disminuyó, esto no se presentó con *N. parviflora* (Barnett, 1976; Barnett, 1998; Muñoz-López *et al.*, 2009). Las cualidades desinfectantes del peróxido de hidrógeno se deben a sus efectos oxidantes. El principal efecto tóxico del H₂O₂ es la oxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática. También provoca daño en la síntesis de proteínas, ya sea oxidando los ácidos nucleicos o dañando las proteínas al modificar su estructura y/o plegamiento. De esta manera, elimina agentes patógenos de la semilla, pero sin dañar el material vegetal; de hecho, se ha reportado que aceleró el inicio de la germinación como fue el caso de *N. parviflora* (Wojtyla *et al.*, 2016). Este efecto de aceleración en la germinación se debe a la interacción que tiene con los reguladores de crecimiento como el ácido abscísico (ABA) que inhiben y giberelinas que promueven la germinación, el H₂O₂ acelera la degradación de ABA y promueve la producción de giberelinas. Además, ayuda en el rompimiento de la cubierta seminal lo que permite la entrada del agua (Barba-Espín *et al.*, 2010; Wojtyla *et al.*, 2016).

Tratamientos de escarificación

De los cuatro ensayos de escarificación realizados, se observó que al exponer a las semillas durante 10 segundos con el ácido, la germinación inició al cuarto día y alcanzó el 80%; al incrementar el tiempo de escarificación a 15 segundos, uno y dos minutos, el inicio de la germinación ocurrió a los 14, 12 y 6 días registrando porcentajes de 40, 40 y 20% respectivamente (Fig. 12).

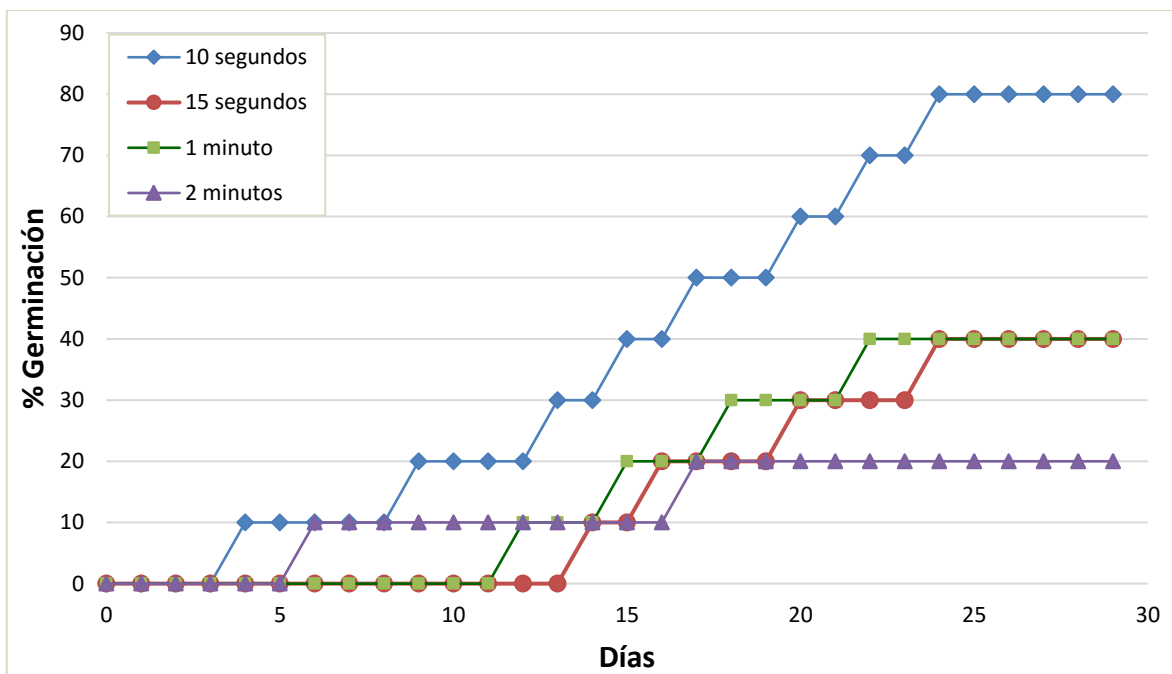


Figura 12. Germinación *in vitro* de *N. parviflora* empleando diferentes tiempos de escarificación con ácido sulfúrico.

Arce y colaboradores (2003) reportaron que la escarificación en ácido sulfúrico a 75 ppm (0.075 mL^{-1}) durante 10 minutos fue la más eficiente para el sotol (*Dasyliirion cedrosanum*) obteniendo 75% de germinación, este porcentaje es muy cercano al obtenido en el presente trabajo para *Nolina* (80%) con 10 segundos en H_2SO_4 concentrado. Por lo que es importante señalar que al emplear bajas concentraciones es necesario prolongar el tiempo de exposición y al ser utilizado el ácido en forma concentrada los tiempos deberán ser breves para evitar el daño que pudiera sufrir el embrión.

Tiempos prolongados de exposición a compuestos químicos pueden resultar negativos, como lo reportado por Vázquez (2005) en *Nolina cespitifera* que expuso las semillas a ácido sulfúrico durante 10, 20 y 30 minutos. Más de 10 minutos resultaron ser letales para los embriones.

Otra opción es la escarificación mecánica, que también se ha llevado a cabo en especies de la misma familia, como lo realizado por Vega-Cruz y colaboradores (2006) quienes escarificaron semillas de *Dasyliirion leiophyllum* y *D. sereke* frotándolas entre dos lijas,

aquellas semillas sin escarificar no germinaron y las semillas escarificadas presentaron 80% de germinación.

Germinación de semillas

Una vez determinado el mejor tren de desinfección y tiempo de escarificación, se obtuvo la curva promedio de la germinación *in vitro* para *N. parviflora*. La germinación inició a partir del cuarto día y el porcentaje máximo (95%) se alcanzó el día 31 (Fig. 13).

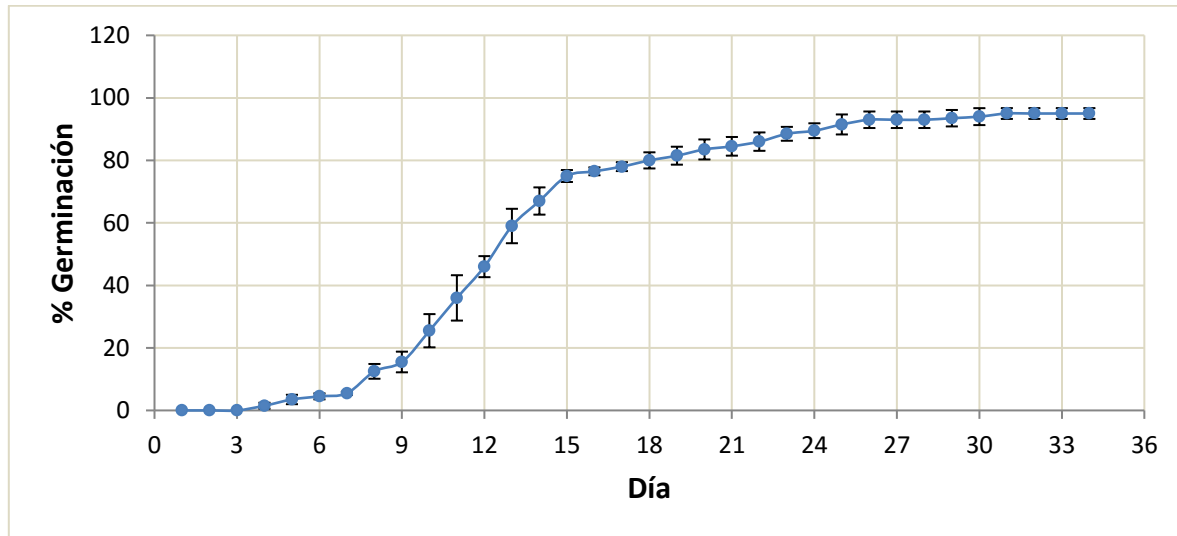


Figura 13. Germinación acumulada *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* expuestas 24 horas en H_2O_2 y posteriormente escarificadas con ácido sulfúrico 10 segundos previo al tren de desinfección. Se sembraron en medio Murashige y Skoog (1961) al 50% de macros, micros y sacarosa.

Reyes-Silva y colaboradores en el 2013 germinaron varias especies de la familia Nolinaceae (*Beaucarnea goldmanii*, *B.gracilis*, *B.recurvata*, *Dasyilirion leiophyllum*, *D. longissimum*, *D.lucidum*, *D.serratifolium*, *Nolina durangensis*, *N. longifolia* y *N. parviflora*) las cuales iniciaron la germinación al día ocho. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en *Beaucarnea gracilis* (96%) y *Dasyilirion leiophyllum* (95%) y la más baja (22%) la registró *Dasyilirion serratifolium*. Las demás especies mostraron un porcentaje de germinación entre el rango reportado, sin embargo, aún y cuando no se especifica para *N. parviflora*, el porcentaje de germinación fue menor al obtenido en el presente trabajo.

Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) reportaron el 89.8% de germinación de *Beaucarnea gracilis* y 95.3% de germinación de *B. recurvata*, en ambos casos la germinación inició cinco días después de la siembra en medio basal MS sin realizar escarificación, estos resultados

son muy similares a lo obtenido en el presente estudio, la similitud en el inicio de la germinación sin escarificación puede deberse a que son diferentes especies de la misma familia.

Castillo-Quiroz y Cano-Pineda (2005) reportan para *N. cespitifera* el inicio de la germinación a los 30 días obteniendo porcentajes entre 41 y 50% en condiciones de invernadero. Reyes-Bautista y Rodríguez-Trejo (2005) reportaron para *N. parviflora* el inicio de la germinación al día 25 y porcentajes de germinación del 85 y 42.3% después de remojar las semillas por 24 h en agua a 20 y 25 °C, respectivamente. Mientras que en el presente trabajo el inicio de la germinación (día 4) y el porcentaje de germinación (95%) fueron más eficientes, lo que demuestra que el protocolo *in vitro* propuesto puede hacer más eficaz la germinación de esta especie.

Descripción de la germinación *in vitro* de *N. parviflora*

En *N. parviflora* la radícula comenzó a emerger a los 4 dds (Fig. 14A), posteriormente emergió el hipocótilo al noveno día (Fig. 14B). A los 12 días se observó la elongación del cotiledón (Fig. 14C), y a los 16 días una planta con tallo, cotiledón y las primeras hojas (Fig. 14D).

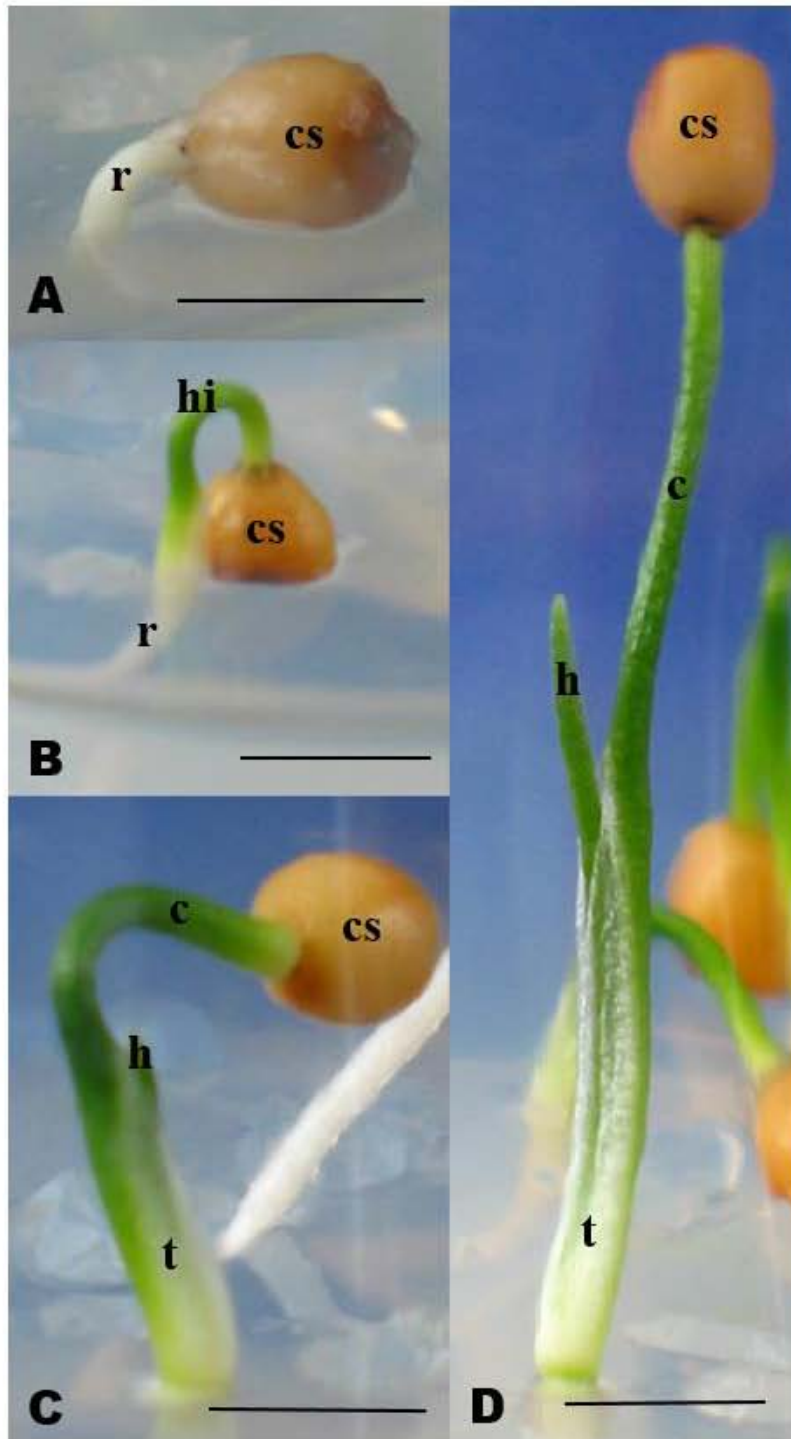


Figura 14. Plántulas de *N. parviflora* germinadas *in vitro*. **A)** Semillas con la radícula emergiendo (germinación). **B)** Semilla con radícula (r), hipocótilo (hi) (5 días), **C)** Elongación del tallo (t) y surgimiento de hoja (h), crecimiento del cotiledón (c) (8 días), **D)** Plántula de 12 días con tallo (t), hoja (h), cotiledón (c) y cubierta seminal (cs). Barra= 0.5 cm

Ensayo preliminar

Explantos de Hojas

Los explantes de hojas no presentaron respuesta en ninguno de los tratamientos ensayados y el control. Después de 15 días, el 100% de ellos se oxidaron (Fig. 15).



Figura 15. Explantes de hoja a los cinco días de cultivo (**Izq**). Después de 2 semanas todos los explantes presentaron signos de oxidación (**Der**). Barra=0.5 cm.

El daño en las hojas pudo ser provocado al realizar el corte en el tejido, los cortes pueden provocar rupturas en organelos como cloroplastos y peroxisomas donde se almacenan enzimas como la polifenol oxidasa, también se rompen vacuolas donde se localizan los sustratos tirosina y fenoles que al encontrarse con la enzima producen especies de oxígeno reactivo las cuales provocan oxidación del tejido (Azofeifa, 2009). La oxidación de los explantes de hoja (media y basal) ocurrió en un corto tiempo de cultivo, el cual no permitió corroborar el potencial morfogénico de este tipo de explante. Se sugiere el remojo de los explantes en una solución de ácido cítrico más ácido ascórbico previo a la siembra o a cada subcultivo como una alternativa para evitar la oxidación, tal como lo reporta Olgúin-Santos (2012) para embriones maduros de *Picea chihuahuana*.

Explantos de Tallos

La formación de brotes ocurrió por organogénesis directa en la periferia del extremo basal del explante. A las tres semanas iniciaron su desarrollo como pequeñas protuberancias de color blanco que después de cuatro semanas se fueron diferenciando en diminutas hojas verdes que durante el tiempo de incubación (siete semanas) se fueron organizando alrededor del ápice en forma arrosada. No hubo desarrollo de brotes en el grupo control (Fig. 16).

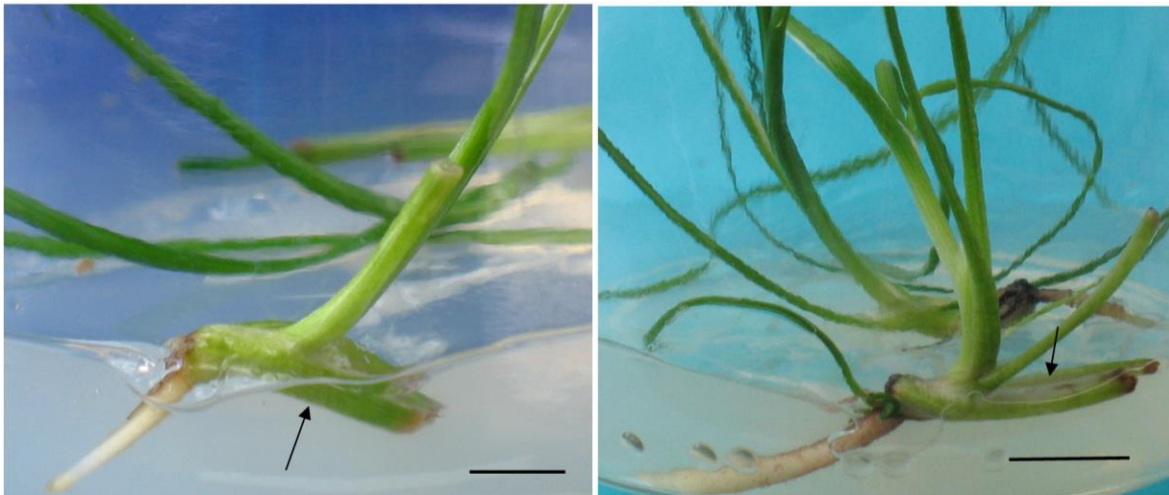


Figura 16. Explantes (→) de tallo de *N. parviflora* en el tratamiento control continuando su desarrollo normal como una planta. Barra= 0.5 cm

Así mismo se presentó el desarrollo de hojas aisladas (no asociadas a un brote) en presencia de BA 3 mgL⁻¹ en explantes de 2 y 4 meses, seguido de BA 2 mgL⁻¹ en explantes de 2, 3 y 4 meses de edad y en el grupo control con explantes de 2 meses, desarrollando en promedio de dos a nueve hojas por explante a las siete semanas después de la siembra (Fig. 17).

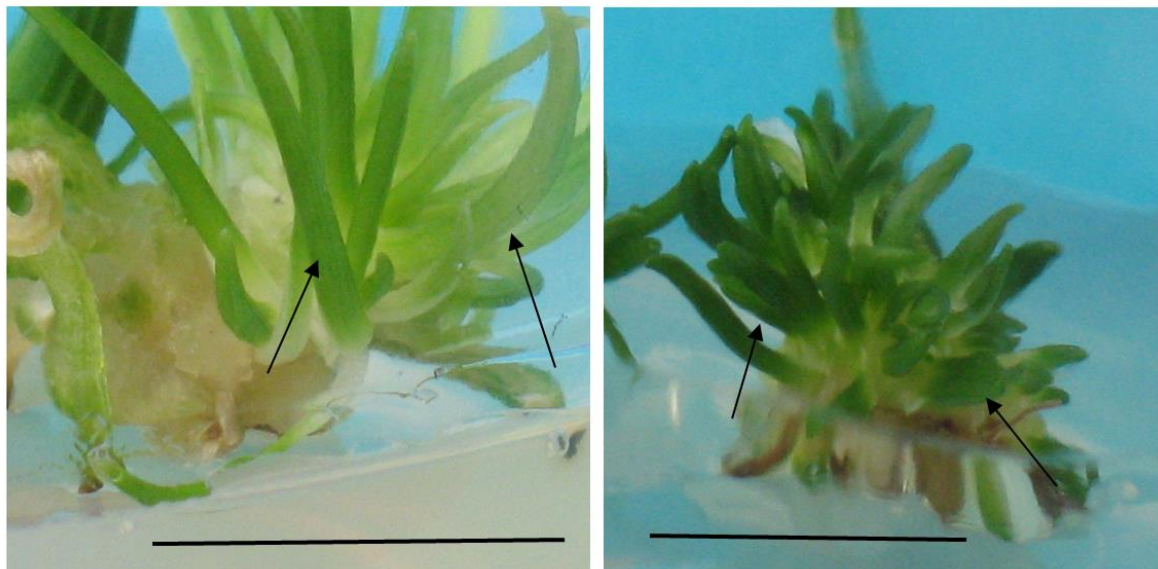


Figura 17. Formación de hojas (→) en explantes de tallo de *N. parviflora* de tres (Izq) y cuatro (Der) meses de edad en BA 2 mg L⁻¹ siete semanas después de la siembra. Barra=0.5 cm

El desarrollo de los brotes se presentó principalmente en el tratamiento con BA 5 mgL⁻¹ en todos los explantes provenientes de plántulas de 2, 3, 4 y 5 meses de edad (Fig. 18), seguido de BA 3 mgL⁻¹ en explantes de 3 y 5 meses y finalmente en 2 mgL⁻¹ con explantes de 5 meses.

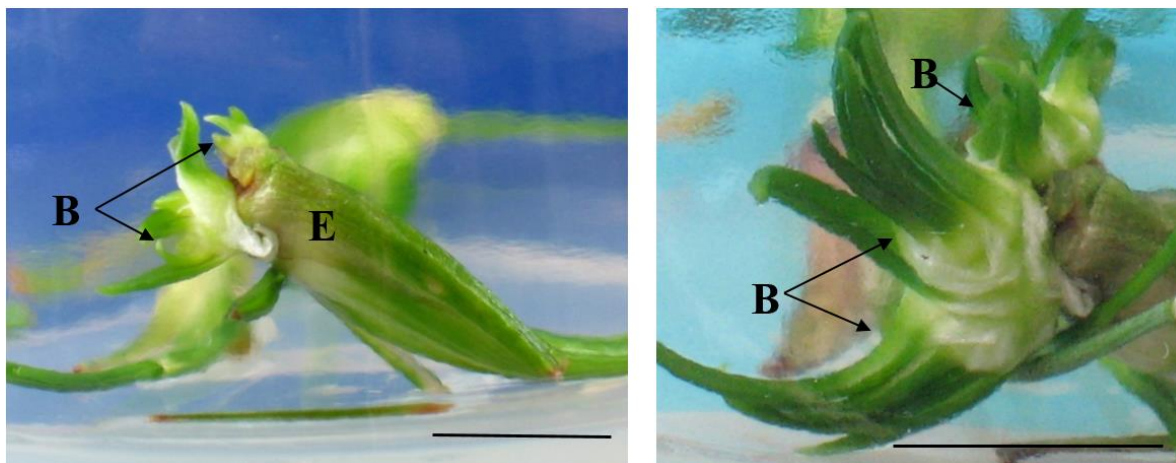


Figura 18. Desarrollo de brotes adventicios a partir de explantes de tallo de cinco meses de edad en BA 5 mg L⁻¹ a las 2 (Izq) y 7 semanas después de la siembra (Der). **B=** Brote y **E=** Explante. Barra=0.5 cm.

El número promedio de brotes por explante fue mayor en BA 3 y 5 mgL⁻¹ (7.3 y 5.7) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de hojas y brotes promedio de *N. parviflora* desarrollados en explantes de diferentes edades expuestos a tratamientos con BA a las siete semanas después de la siembra.

		Edad del explante (meses)			
		2	3	4	5
BA (mgL ⁻¹)	0	Hojas 2±0	0	0	0
	2	Hojas 3±1	Hojas 5.3±2.4	Hojas 9±2	Brotes 2±0.6
	3	Hojas 7.3±1.8	Brotes 5±1	Hojas 6.5±0.5	Brotes 7.3±1.2
	5	Brotes 5.7±0.3	Brotes 4.5±0.5	Brotes 5±1	Brotes 4.5±1.5

Las investigaciones de micropropagación en *N. parviflora* en general son escasas, se han realizado pruebas en otros géneros como *N. recurvata* (Bettaieb *et al.*, 2008) donde utilizaron como explante yemas apicales de brotes axilares de plantas adultas de 10 años en medio MS 50% adicionado con BA + IBA en la misma concentración (0.1 mgL^{-1}) con lo que obtuvieron 6 brotes por explante. Vadillo (2012) llevó a cabo la propagación de *Beaucarnea compacta* y *B. purpusii*, empleando como explantes el tallo de plántulas germinadas *in vitro*, utilizó BA 5 mgL^{-1} obteniendo 23 brotes por explante. Otro reporte con *B. inermis* señalan que utilizaron explantes de tres meses de edad cultivados en BA 2 mgL^{-1} obteniendo 15.7 brotes por explante (Guillen *et al.*, 2015).

Se puede inferir que la capacidad morfogénica de los explantes estuvo asociada a una conjunción entre la edad del explante y la concentración del regulador de crecimiento que se utilizó. En el caso de *Nolina* los explantes de dos, tres y cuatro meses de edad expuestos a concentraciones de BA 2 y 3 mgL^{-1} , tendieron a formar hojas y a no organizarse como un brote. Se observa con más precisión que la mayor concentración empleada en este trabajo (5 mgL^{-1}) tuvo un efecto positivo en la formación de brotes, éstos se desarrollaron en mayor proporción (5.7) en el explante más joven (dos meses). Por otro lado fue posible observar que los explantes de cinco meses también formaron brotes en los tratamientos con la citocinina, siendo la combinación más favorable BA 3 mgL^{-1} (7.3), lo que nos indicó que un explante de edad relativamente intermedia tuvo buena capacidad morfogénica. Esto es similar a lo reportado por Vadillo, 2012 y Guillen y colaboradores 2015, quienes demostraron que la combinación adecuada del regulador de crecimiento y la edad del explante son factores importantes para obtener una cantidad óptima de regenerantes.

En otras familias, también se ha hecho investigación sobre la edad del explante, como en *Vigna mungo* una especie de importancia económica para el sur de Asia (Raman y Jaiwal, 2002), para la que probaron explantes de cotiledón de 3, 8, 12 y 17 días de edad colocadas en medio MS B5 (Medio MS + sales B5) + BA 1.13 mgL^{-1} . En este trabajo obtuvieron que la frecuencia de regeneración aumentaba con la edad (77%) a diferencia de los más jóvenes

(3 días de edad) que presentaron un porcentaje de regeneración de explantes de 33%. La cantidad de brotes por explantes (3.6) también aumentó con la edad.

En el cultivo *in vitro* lo más usual es que el explante sea joven, pero el periodo de juvenilidad varía entre especies, en el caso de *N. parviflora* este periodo pudiera ser prolongado ya que alcanza la madurez sexual hasta los 60 años, por lo tanto los explantes de tallo de meses de edad mantienen sus características regenerativas, lo que da lugar a que los periodos que podrían ser considerados largos en otras especies no son los mismos para *N. parviflora* y puedan conservar su potencial regenerativo hasta los cinco meses de edad (Caso, 1992; Rojas-González *et al.*, 2004; Mroginski *et al.*, 2010).

En *N. parviflora* los explantes con mayor potencial regenerativo para la formación de brotes adventicios fueron aquellos procedentes de plántulas de cinco meses y expuestos con BA 3 y 5 mg L⁻¹ donde se obtuvieron las mayores cantidades de brotes por explante con características morfológicas apegadas a las de la especie. Es por esto que se eligieron brotes de cinco meses y expuestos a las dos concentraciones de citocinina anteriormente mencionadas como los más adecuados para realizar la micropropagación.

Micropropagación

Una de las respuestas morfogénicas observadas fue la formación de hojas aisladas, no dispuestas en roseta de forma ordenada, por lo que no se consideraron como brotes propiamente dichos. Esta respuesta ocurrió en ambos tratamientos, BA 3 y 5 mgL⁻¹ (Fig. 19). Estas estructuras fueron separadas y subcultivadas en medio de proliferación donde aumentaron de tamaño y posteriormente a medio de enraizamiento donde no formaron raíces.

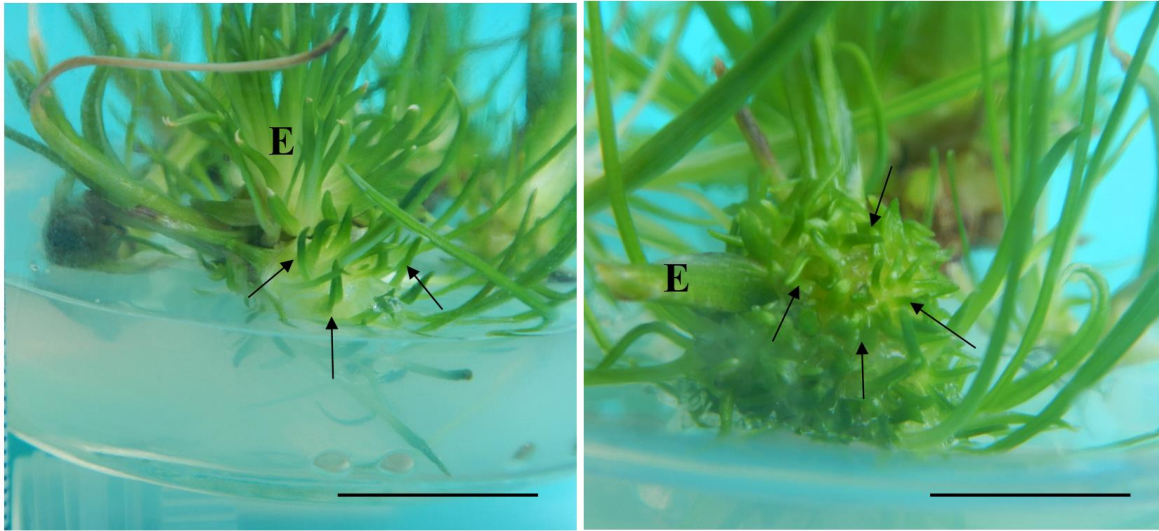


Figura 19. Formación de hojas aisladas (→) no dispuestas en roseta en explantes de tallo de cinco meses de edad después de doce semanas en BA 3 mgL⁻¹ (Izq) y 5 mgL⁻¹ (Der). E= Explante. Barra= 1cm

Se observó que los explantes de tallo de *N. parviflora* de cinco meses de edad iniciaron el desarrollo de brotes adventicios dos semanas después de la siembra en el medio de inducción. Comenzaron su desarrollo en la parte basal del explante donde se presentó un incremento en su tamaño y el tejido externo adquirió un color blanco que posteriormente se tornó amarillo crema con unas zonas verdes definidas que son el extremo apical de lo que será una hoja, a diferencia de las hojas que se desarrollaron de forma aislada, éstas se agruparon (Fig. 20).

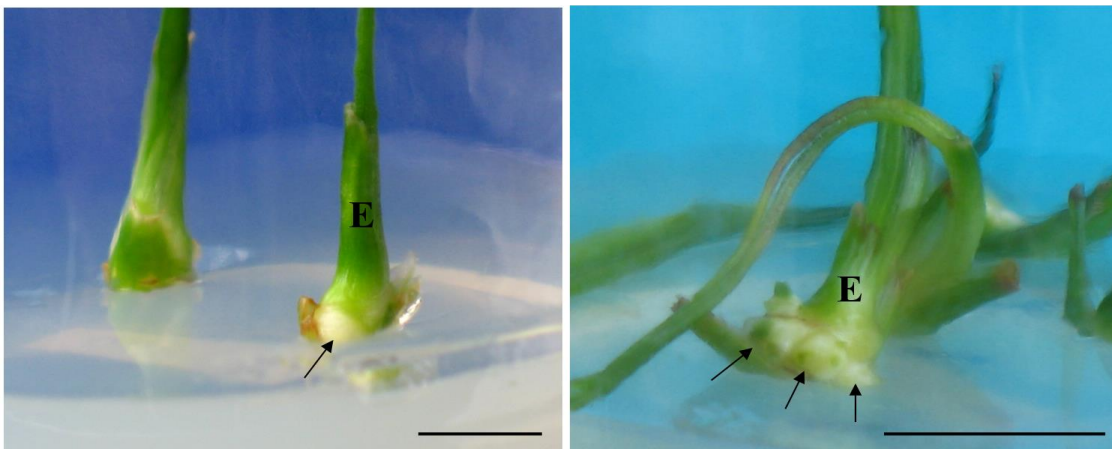


Figura 20. Desarrollo de brotes (→) de tallo de *N. parviflora* a las dos (Izq) y tres (Der) semanas después de la siembra. E= Explante Barra= 0.5cm

Después de cuatro semanas, las zonas verdes siguieron desarrollándose para formar las hojas del brote. Cinco semanas después, los brotes alcanzaron un promedio de 1 cm y se diferenciaron totalmente (Fig. 21).

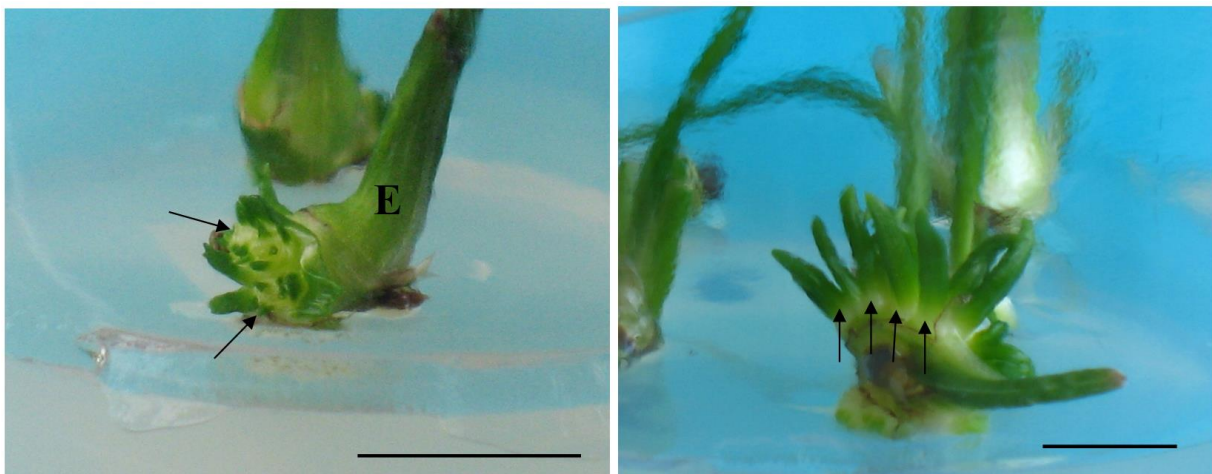


Figura 21. Desarrollo de brotes (→) de tallo de *N. parviflora* a las cuatro (Izq) y cinco (Der) semanas después de la siembra. E= Explante Barra= 1 cm

El 10% de los explantes ya habían desarrollado brotes bien diferenciados a las cuatro semanas (Fig. 22), el resto respondió hasta las siete semanas.

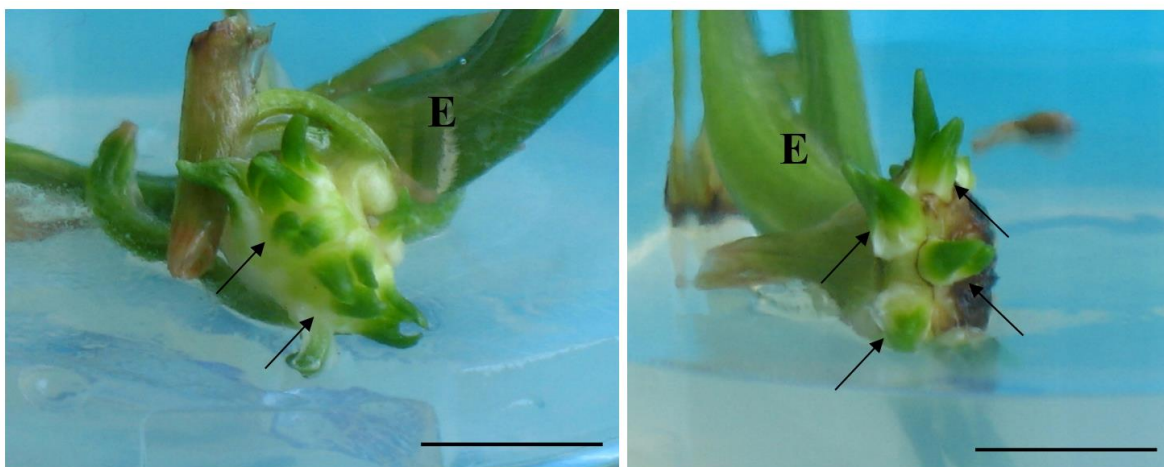


Figura 22. Formación de brotes (→) de *N. parviflora* en explantes de tallo de cinco meses de edad, en BA 3 mgL⁻¹ (Izq) y 5 mgL⁻¹ (Der) después de cuatro semanas de iniciado el cultivo. E= Explante. Barra= 0.5 cm.

A partir de la semana 12 el 100% de los explantes presentó brotes diferenciados, que medían más de dos centímetros (Fig. 23).

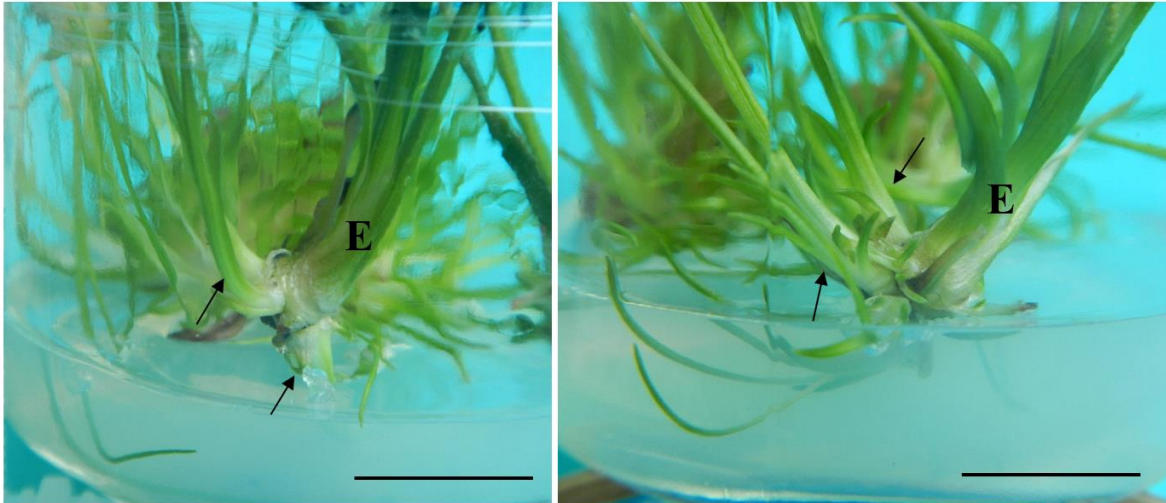


Figura 23. Formación de brotes (→) de *N. parviflora* en explantes de tallo de cinco meses de edad, en BA 3 mgL⁻¹ (Izq) y 5 mgL⁻¹ (Der) después de 12 semanas de iniciado el cultivo. E= Explante. Barra= 1cm.

Después de 25 días en medio de inducción, el promedio de brotes por explante en el tratamiento BA 3 mg L⁻¹ fue de 5.7±0.5 y 5.6±0.4 b/e en BA 5 mg L⁻¹. De acuerdo con el análisis estadístico no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (prueba de Mann-Whitney dio un P-valor= 0.779).

Reyes-Silva y colaboradores, en 2013, cultivaron *in vitro* tres especies de *Nolina* utilizando explantes de tallo de plántulas de uno a dos meses de edad germinadas *in vitro*. Para *N. parviflora* obtuvieron un promedio de 2.9 brotes por explante de tallo cultivados con BA 4 mgL⁻¹ después de ocho semanas. Los mismos autores reportaron para *N. duranguensis* un promedio de 7.8 brotes por explante, y para *N. longifolia* 7.7 b/e en las mismas concentraciones que la primera en el mismo periodo de tiempo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo para *N. parviflora* duplicaron en número a lo reportado por Reyes-Silva y colaboradores y fueron muy similares a los obtenidos en *N. duranguensis* y *N. longifolia*.

Los trabajos sobre la propagación *in vitro* de especies de *Nolina* (21-30 especies), son escasos; se ha reportado la metodología de propagación en vivero de *N. cespitifera* (Castillo-Quiroz y Cano-Pineda, 2005) pero los trabajos *in vitro* se han centrado en las especies de *Nolina* antes mencionadas.

En cuanto a otras especies de la misma familia, el número de brotes por explante reportadas por Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) a partir de explantes de tallo de plántulas germinadas *in vitro* de tres meses de edad en BA 5 mgL⁻¹ de *B. recurvata* fue de 1.5 y Castañeda y Santacruz (2008) reportaron para la misma especie 10.9 b/e en la misma concentración hormonal, mientras que en el presente trabajo se obtuvo 5.6 b/e en las mismas condiciones reportadas por Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005).

El uso de sólo un tipo de hormona (BA) es común en la regeneración de especies de esta familia, como es el caso de *Dasyllirion*, donde se propagaron *D. leiophyllum*, *D. serratifolium*, *D. lucidum* y *D. longissimum* utilizando explantes de tallo de plántulas germinadas *in vitro* de uno a dos meses de edad en medio MS + BA 4 mgL⁻¹, obteniendo 10.3, 6.8, 6.9 y 2.2 brotes por explante a través de organogénesis directa en un periodo de ocho semanas. Estos autores han realizados pruebas con otras citocinininas además del BA, como 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina (2iP), tidiazurón (TDZ) y metatopolina (MT), los resultados difieren entre las especies pero la mayoría de éstas presentan mejores resultados con BA (Reyes-Silva *et al.*, 2013).

Formación de callo

Otra de las respuestas que se obtuvo fue la formación de callo que se desarrolló en la base del tallo y cerca de los brotes ya formados entre las semanas 7 y 9 después de la siembra. El callo inició con un crecimiento desorganizado de color verde vítreo que al pasar el tiempo aumentó su tamaño y después de 12 semanas en medio de inducción se oxidó sin dañar a los brotes y hojas (Fig. 24). Este callo se presentó en muy pocas cantidades lo que no permitió realizar una medición cuantitativa de este.

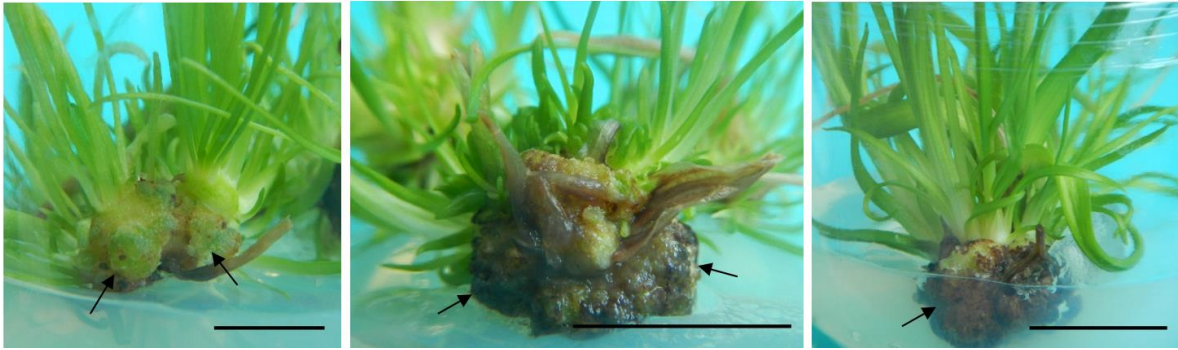


Figura 24. Formación de callo (→) en explantes de tallo de *N. parviflora* en BA 5 mgL⁻¹ nueve semanas después de la siembra (**Izq**). A las 12 semanas el callo se oxidó en ambos tratamientos, BA 5 mgL⁻¹ (**Centro**) y 3 mgL⁻¹ (**Der**). Barra= 1 cm

La formación de callo en monocotiledóneas se ha reportado en concentraciones altas de auxinas y bajas de citocininas (Howell *et al.*, 2003; George *et al.*, 2008); esto es similar a lo obtenido en *N. parviflora* (Flores *et al.*, 2009) donde se obtuvo callo en diferentes concentraciones de auxinas 2,4-D, AIB, ANA y AIA (0.002 hasta 4.5 mgL⁻¹) el cual no se diferenció. Contrario a lo anterior, en el presente trabajo, el callo se obtuvo utilizando sólo citocinina en concentraciones relativamente altas de BA (3 y 5 mgL⁻¹), lo mismo sucedió en *B. inermis* (Guillen *et al.*, 2015) que desarrolló callo en explantes de ápice de tallo sembrados en BA 2 mgL⁻¹ y que regeneraron brotes adventicios al sembrarlos solo en BA o en combinación con ANA. El desarrollo de callo en esta familia como se muestra en estas investigaciones, no necesariamente requiere auxinas como tradicionalmente se reporta en la bibliografía. La auxina es necesaria para la regeneración de brotes o embriones, en el caso de *N. parviflora* no se le dio seguimiento al desarrollo de callo debido a la oxidación, pero se propone para investigaciones futuras.

Enraizamiento

Los brotes obtenidos en la etapa de proliferación fueron individualizados cuando alcanzaron los 5 cm de longitud y sembrados en medio MS 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa como medio de elongación, los brotes comenzaron a enraizar en este medio. Para optimizar la formación de raíces, los brotes se plantaron en medio MS 50% + carbón activado 1 gL⁻¹.

La formación de las raíces se observó a partir de la primera semana en ambos medios de cultivo. A la tercera semana las raíces se elongaron alcanzando una longitud aproximada de 2 cm, a las ocho semanas las raíces median 10 cm aproximadamente (Fig. 25).

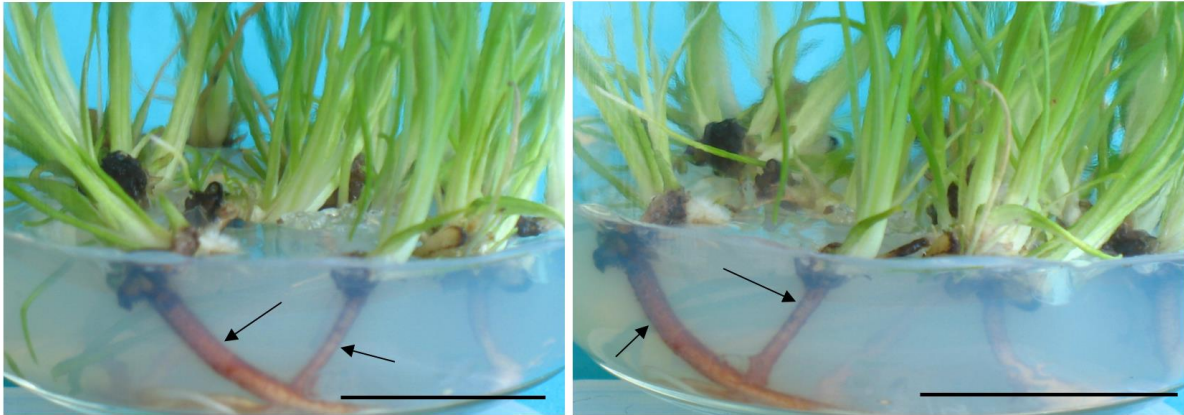


Figura 25. Obtención de raíces (→) en medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa después de ocho semanas. Barra= 1 cm

El porcentaje de brotes enraizados se evaluó después de ocho semanas: en el medio de enraizamiento, el mayor porcentaje (66.3%) se obtuvo en los brotes procedentes de BA 5 mgL^{-1} , y 51.3% en BA 3 mgL^{-1} . En el medio de elongación (MS 50%) los brotes enraizados procedentes de BA 3 mgL^{-1} fue de 12% y 22.4% de los provenientes de BA 5 mgL^{-1} (Fig. 26).

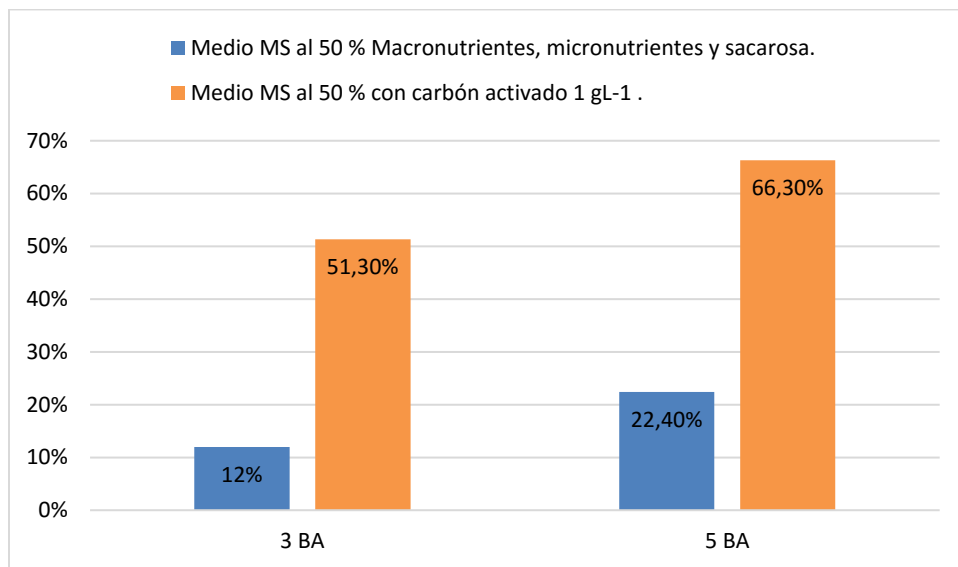


Figura 26. Porcentaje de brotes enraizados de *N. parviflora* provenientes de los tratamientos con BA 3 y 5 mgL^{-1} en dos medios de cultivo.

Vadillo (2012) enraizó brotes de *B. compacta* y *B. purpusii* con concentraciones similares a las utilizadas en el presente trabajo (MS 50% + C.A. 1 gL⁻¹) donde obtuvo 100% y 80% de brotes enraizados. Reyes-Silva y colaboradores (2013) reportaron el 86%, 83% y 95% de brotes enraizados de *N. duranguensis*, *N. longifolia*, *N. parviflora* después de 50 días en medio MS + CA 2 gL⁻¹. En los trabajos anteriormente citados se obtuvo un mayor porcentaje de enraizamiento en comparación con el presente trabajo (66.3%) aunque se empleó la misma cantidad de CA para el caso de *Beucarnea*, esta diferencia se debe probablemente a que son especies diferentes y a que se utilizó una mayor concentración de CA.

Otro aspecto a considerar es que las citocininas inhiben la rizogénesis si se exponen los brotes por periodos prolongados (Rojas-González *et al.*, 2004), como es el caso de *Hylocereus costaricensis* y *Nopalea cochenillifera*, que al reducir los niveles de BAP en la fase de proliferación inició el enraizamiento en medio sin reguladores de crecimiento, esto demuestra el efecto inhibitorio de las citocininas (Viñas *et al.*, 2012 y Brasil *et al.*, 2005). Este efecto de las citocininas puede ser una de las causas del bajo porcentaje de los brotes enraizados en *N. parviflora* como se observó en el presente estudio, donde brotes provenientes de BA 3 mgL⁻¹ presentaron solo el 12% de enraizamiento y el 22.4% en los provenientes de BA 5 mgL⁻¹.

La reducción de sales en la composición del medio de cultivo ejerce un estrés fisiológico en las plantas, razón por la cual producen raíces en busca de posibles fuentes de nutrientes físicamente alejadas, con el fin de acelerar el desarrollo radicular (Villalobos y Thorpe, 1993; Salisbury y Ross, 1994). Esto se ha reportado en varias especies, como en *Agave angustifolia*, en la que se duplicó la cantidad de raíces utilizando medio MS al 75%+ Ácido indolbutírico (AIB) 1mgL⁻¹, en *A. americana* se obtuvieron 7.9 raíces adventicias al disminuir las sales al 66% + AIB 0.5 mgL⁻¹ o en mora (*Rubus sp.*) que se redujo a la mitad el tiempo de inicio de enraizamiento en medio MS al 50% + AIB 0.5 mgL⁻¹ (Enríquez del Valle *et al.*, 2005; Flores-Mora *et al.*, 2011; Miguel-Luna *et al.*, 2013).

En los brotes procedentes de ambos tratamientos el medio que mejor promovió la formación de raíces fue el que contenía carbón activado. Este compuesto se utiliza como

adsorbente de compuestos fenólicos debido a su estructura química lo que evita la oxidación del material vegetal. También es utilizado para el obscurecimiento del medio para enraizar brotes, ya que esto crea un ambiente adecuado para el desarrollo de las raíces debido a que se asemeja al suelo en el ambiente natural (Thomas, 2008; Luna *et al.*, 2007; Pedroza-Manrique, 2009).

Es importante señalar que el género *Nolina* tiene aproximadamente 30 especies de las cuales 20 se encuentran en México y 11 son endémicas, a pesar de esta diversidad hay muy pocos protocolos de propagación *in vitro*, los cuales sólo se han desarrollado para *N. duranguensis*, *N. longifolia* y *N. parviflora* donde se reportan un rango de 1.4 a 10 brotes por explante. Reyes–Silva y colaboradores (2013) emplearon explantes de tallo de *N. parviflora* de 1-2 meses de edad y los cultivó en medio MS + BA 5 mgL⁻¹ obteniendo 2.9 brotes por explante. La principal diferencia entre el trabajo citado y el presente fue la evaluación y determinación de la edad del explante para incrementar el número de regenerantes.

Por lo tanto, el presente trabajo es una aportación de la respuesta obtenida a la relación entre la edad del explante y la concentración de reguladores de crecimiento. Esto da pie a más investigaciones que corroboren con un mayor número de réplicas, la relación de estos parámetros y poder analizarlos con pruebas estadísticas para obtener datos más precisos.

CONCLUSIONES

- La velocidad de germinación fue mayor al remojar las semillas (24h) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y escarificarlas 10 segundos con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) previo al tren de desinfección.
- La germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* inició a los 4 días y alcanzó el máximo porcentaje (95%) a los 31 días después de la siembra en medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa.
- La respuesta de los explantes de hojas medias y basales a la inducción con reguladores de crecimiento fue nula y finalmente se oxidaron.
- Los explantes de tallo fueron los únicos regenerativos. Las respuestas morfogénicas observadas fueron la formación de hojas aisladas y de brotes adventicios, ambos por organogénesis directa.
- Las bajas concentraciones de BA promovieron la formación de hojas aisladas en los explantes de tallo de menor edad (2, 3 y 4 meses) excepto en los de 5 meses que sí formaron brotes.
- Los mejores resultados de propagación se obtuvieron al utilizar explantes de tallo de 5 meses con BA 3 mgL^{-1} (5.7 b/e) y con BA 5 mgL^{-1} (5.6 b/e).
- La edad del explante influyó en el número de brotes formados cuando las concentraciones de BA fueron bajas, en concentraciones mayores de BA (5 mgL^{-1}) la edad del explante no fue un factor que afectara el número de brotes por explante.
- Los mejores porcentajes de brotes enraizados provenientes de explantes en BA 3 (51.3%) y 5 (66.3%) mgL^{-1} se obtuvieron en el medio MS 50% + C.A. 1 gL^{-1} .
- En 12 semanas se obtuvo un promedio de 460 plántulas a partir de 80 semillas germinadas *in vitro*, esto demuestra que el CTV es una herramienta adecuada para la propagación de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar M., L. Melgarejo y M. Romero. 2010. Fitohormonas. En: Melgarejo L. (Ed.). Experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. Pp. 39-62.
- Álvarez J. 2015. Catálogo ilustrado de las especies arborescentes de los géneros *Beaucarnea*, *Nolina* y *Yucca* (Asparagaceae) de las regiones áridas y semiáridas de México. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estado De México. 137 p.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105
- Arce-Montoya M., M. Rodríguez-Álvarez, J. Hernández-González y M. Robert. 2006. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant Cell Reports* 25: 777-783.
- Arias-Toledo A. A., M. T. Valverde-Valdés y J. Reyes-Santiago. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. 80 p.
- Arizona-SonoraDesertMuseum. 2016. Página en red: https://www.desertmuseum.org/books/nhsd_nolinaceae.php. Consultada 8 de mayo de 2017.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomia Mesoamericana* 1: 153 – 175.
- Barba-Espín G., P. Díaz-Vivancos, M.J. Clemente-Moreno, A. Albacete, L. Faize, M. Faize, F. Perez-Alfocea y J.A. Hernández. 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and early growth of pea seedlings. *Plant Cell & Environment* 33: 981-994.
- Barnett J.P. 1976. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. *Tree Planters Notes* 27: 17-19.
- Barnett J.P. 1998. Desinfecting seeds with hydrogen peroxide. *Forest Nursery Notes*. Pp. 22-23.
- Bettaieb T., M. Mhamdi, e I. Hajlaoui. 2008. Micropropagation of *Nolina recurvata* Hemsl.: β -Cyclodextrin effects on rooting. *Scientia Horticulturae* 117: 366-368.
- Brasil J., E. Jereissati, M. Santos y F. campos. 2005. *In vitro* micropropagation of *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79:160-162.

- Caso O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agroscientia* 1: 5-16
- Castañeda J. y F. Santacruz. 2008. Propagación masiva *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire Nolinaceae). En: Carvajal S. y E. Pimienta (Eds). Avances en la investigación científica en el CUCBA. Universidad de Guadalajara. Jalisco. México. Pp. 19-24.
- Castañeda-Nova J.J., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Mora y L. Portillo. 2011. Micropropagación de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* LEMAIRE (Nolinaceae)) en medios sólidos y sistemas de inmersión temporal en líquido. En Martínez A. (Ed.). 2011. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería. Querétaro. México.
- Castillo-Quiroz D. y A. Cano-Pineda. 2005. Guía técnica para el establecimiento de plantaciones de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.) para la producción de fibras duras en el estado de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm. 16. Coahuila, México. 23 p.
- Cervantes V., A. Orozco, M. Rojas, E. Sánchez y C. Vásquez. 1997. La reproducción de plantas: semillas y meristemas. Fondo de Cultura Económica, México. 167 p.
- Ching T. 1959. Activation of germination in Douglas fir seed by hydrogen peroxide. *Plant Physiology*. 34: 557-563.
- CONANP. 2016. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Áreas Naturales Protegidas. Página en red: <http://www.conanp.gob.mx/regionales/>. Consultada 14 de octubre de 2016.
- Contreras A., M. L. Osorio, M. Equihua y G. Benítez. 2008. Conservación y aprovechamiento de *Beaucarnea recurvata*, especie forestal no maderable. *Cuadernos de biodiversidad* 28: 3-9.
- Cruse R. 1949. A chemurgic survey of the desert flora in the American southwest. *Economic Botany* 3: 111-131.
- Cruz-Cruz J- 2017. Germinación *in vitro* y Micropropagación de Sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.). Tesis para obtener el título de Ingeniero en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía. Departamento de Botánica. Saltillo. Coahuila. México. 45 p.
- Domínguez-Rosales M., A. Alpuche-Solís, N. Vasco-Méndez y E. Pérez-Molphe. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 317- 322.

- Enríquez del Valle J. R, G. Carrillo-Castañeda, J. L. Rodríguez de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 2: 175-178.
- Flores A., J. Álvarez, J. Rodríguez de la O y A. Corona. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K) Hemsl. *Foresta Veracruzana*10: 27-33.
- Flores A., J. Álvarez, J. Rodríguez de la O y A. Corona. 2009. Respuestas organogénicas *in vitro* de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 11: 25-32.
- Flores-Mora D., R. Chacón-Cerdas, V. Jiménez-Bonilla y F. Ortiz-Sancho. 2011. Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero. *Tecnología en marcha* 2: 3-9.
- Galván V. 2001. Nolinaceae. En: Rzedowski, G.C. de y J. Rzedowski (Eds.). Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. Instituto de Ecología. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. Pp. 1239-1242.
- García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, UNAM. México, D. F. 252 p.
- García F., Roselló J. y M. Santamarina. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Universidad Politécnica de Valencia. España. Pp. 81-118.
- George E., M. Hall y G. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. TheBackground. Springer. EU. 501 p.
- Golubov J., M. C. Mandujano, S. Arizaga, A. Martínez-Palacios y P. Koleff. 2007. Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae. En: Colunga-García P., A. Larqué, L. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal (Eds.). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Pp. 133-152.
- Guillen S., A. Martínez-Palacios, H. Martínez y J.G. Martínez-Avalos. 2015. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences* 93: 221-230.
- Hernández-Xolocotzi E. 1987. Experiencia mexicana en zonas áridas. En: Hernández-Xolocotzi E. (Autor).Xolocotzia: Obras de Efraím Hernández Xolocotzi. Tomo II. Universidad Autónoma Chapingo. México, D. F. Pp. 551- 563.
- Howell S. H., S Lall y P. Che. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science* 9: 453-459.

- IMPI. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. 2002. Declaración de protección a la denominación de origen sotol. Diario Oficial de la Federación (8 de agosto de 2002). México D.F.
- Iriondo J. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Investigación agraria. *Producción y Protección Vegetal* 16: 5-24.
- Kim F. F. y M.W. Chase. 2010. Molecular Phylogenetics of Ruscaceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 5: 775-790.
- Kumar P. y C. Shiong. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. En: Altman A. y P. Hasegawa (Eds.). *Plant Biotechnology and Agriculture Prospects for the 21st Century*. Elsevier, EU p. 131 - 138.
- Lascuráin M, R. Litz, L. Barraza, E. Díaz-Pardo, F. Gual-Sill, M. Maunder, J. Dorantes y V. E. Luna. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: CONABIO. 2009. Capital natural de México. Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO. México. Pp. 517-544.
- López A. L. y L. P. Olgún. 2013. El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). *Biología de angiospermas*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp. 521 – 527.
- López M. 1986. Esfuerzo reproductivo y sobrevivencia de *Nolina parviflora* (Liliaceae) en la zona semiárida Poblano-Veracruzana. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo. Texcoco. Estado de México. 89 p.
- Lugo-Hubp J., Mooser F., Pérez-Vega A. y J. Zamorano-Orozco. 1994. Geomorfología de la Sierra de Santa Catarina. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 11: 43-52.
- Luna D., A González, M. Gordon y N. Martín. 2007. Obtención de carbón activado a partir de la cascara de coco. *Contactos* 64: 39-48.
- Martínez B. y D. Castillo. 2007. Identificación de sitios para plantaciones de Cortadillo *Nolina cespitifera* Trel. en el sureste de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm. 34 Coahuila, México. 38 p.
- Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares, científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 1247 p.

- Miguel-Luna M. E., J. R. Enríquez- del Valle, V. A, Velasco-Velasco, Y. Villegas-Aparicio, J. C. Carrillo-Rodríguez y G. Rodríguez-Ortiz. 2013. Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 6: 1151-1159.
- Miller C.O., F. Skoog, F.S. Okumura, M.H. vonSaltza, F.M. Strong FM. 1955. Kinetin, A cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 77: 1392.
- Mroginski L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivo de tejidos Vegetales. En: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. INTA-Argen BIO. Argentina. Pp. 17-25.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Muñoz-López C., E. Cuervo-Sánchez, M. Ampudia-Díaz, A. Gastón González, J.L. Peñuelas-Rubira, S. Iglesias-Sauce y N. Herrero-Sierra. 2009. Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donell en semillas del género *Pinus*. 5° Congreso Forestal Español. Pp. 2- 12.
- Olgún-Santos L. P. 2012. Organogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez (Pinaceae). Tesis de Maestría (Biología Vegetal). Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias UNAM. México. 135 p.
- Osorio-Rosales M. y M. Mata-Rosas. 2005. Micropropagation of endemic and endangered mexican species of ponytail palms. *Horticulture Science* 40: 1481-1484.
- Osuna R., A. Brechú, M. Collazo y F. García. 2013. Controles del desarrollo y la morfogénesis. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp.185-202.
- Pedroza-Manrique J. A. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 1: 17-32.
- Pérez-Molphe E., R. Ramírez, H. Núñez, N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 179 p.
- Pérez-Ponce J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390 p.

- PMANP. 2005. Programa de manejo del área natural protegida con carácter de zona de conservación ecológica "Sierra de Santa Catarina". Gaceta Oficial del Distrito Federal (19 de Agosto de 2005). México, D.F.
- Radice S. Morfogénesis. 2010. En: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. INTA-ArgenBIO. Argentina. Pp. 26-33.
- Raman S. y P. K. Jaiwal. 2002. Age, position in mother seedling, orientation and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science* 163: 101-109.
- Ramírez G. y T. Rodríguez. 2002. Asentamientos humanos y sustentabilidad ambiental en la Sierra de Santa Catarina. Tesis de Licenciatura (Sociología). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. 149 p.
- Reed B. M., V. Sarasan, M. Kane, E. Bunn y V. C. Pence. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Developmental Biology plant* 47: 1-4.
- Reyes-Bautista Z. y D. Rodríguez-Trejo. 2005. Efecto de la luz, temperatura y tamaño de semilla en la germinación de *Nolina parviflora* (H.B.K) Hemsl. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 11: 99-104.
- Reyes-Silva A., C. Morales-Muñoz, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2013. Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia* 58: 12-20.
- Reyes-Valdés M. H., A. Benavides-Mendoza, H. Ramírez-Rodríguez y J.A. Villarreal-Quintanilla. 2012. Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion spp.*) Parte I: Sistemática, genética y reproducción. *Planta* 14: 11-13.
- Reyes-Valdés M. H., A. Benavides-Mendoza, H. Ramírez-Rodríguez y J.A. Villarreal-Quintanilla. 2013. Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion spp.*) Parte II: Ecofisiología, usos e interrogantes. *Planta* 17: 16-20.
- Rivas M. 2000. Conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos. En: Berretta A. y M. Rivas (Cords.). 2000. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. PROCISUR. Pp. 63-76.
- Rojas-González S., J. García-Lozano y M. Alarcón-Rojas. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies Amazónicas. Corpoica. Colombia. Pp. 10-13.
- Rojas-Piña V., M. E. Olson, L. O. Alvarado-Cárdenas y L. E. Eguiarte. 2014. Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. *Taxon* 6: 1193-1211.

- Salisbury F. y C. Roos. 1994. Fisiología Vegetal. Parte Tres. Desarrollo Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. Pp. 363-591.
- Sánchez J. 1981. La Palmilla (*Nolina spp.*): una planta de interés económico. *Revista Ciencia Forestal* 31: 3-17.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* (30 de diciembre de 2010). México, D.F.
- Shreve F. y L. Wiggins. 1964. Vegetation of the Sonoran Desert. Vol. I, II. Stanford University Press. Stanford, California. 1740 p.
- Sierra-Tristán J. S. y A. Melgoza-Castillo. 2014. Los sotoles. En: CONABIO. La biodiversidad en Chihuahua: Estudio de Estado. CONABIO. México. Pp. 167-169.
- Solano E. y M. Rivera-Lugo. 2012. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 99. Nolinaceae Nakai. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 1- 68.
- Tomas T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances* 26: 618-631.
- Thorpe T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169–180.
- Trelease W. 1911. The desert Group Nolineae. *Proceedings of the American Philosophical Society* 200: 404-443.
- Vadillo M. C. 2012. Organogénesis y regeneración de *Beaucarnea compacta* L. Hern. Y Zamudio y *Beaucarnea purpusii* Rose, especies endémicas amenazadas. Tesis Maestría (Ciencias en Recursos Bióticos) Universidad Autónoma de Querétaro. México. 109 p.
- Vázquez F. 2005. Inducción del crecimiento de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.) mediante aplicación de fitorreguladores. Tesis de Licenciatura (Ingeniería Agraria). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, División de Agronomía. Coahuila, México. 78 p.
- Vega-Cruz J., A. Melgoza-Castillo y J.S. Sierra-Tristán. 2006. Caracterización del crecimiento de dos especies de sotol (*Dasyliirion leiophyllum* Engelm. X Trelease y D. Sereke Bogler) fertilizadas con nitrógeno y fosforo. *Revista Ciencia Forestal en México* 31: 55-71.

- Villalobos V. M. y T. A. Thorpe. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski. 1993. Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Pp. 127-141.
- Villavicencio G., A. Cano y A. Juárez. 2007. Guía para la micropropagación y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm. 37 Coahuila, México. 29 p.
- Viñas C, M. Fernández-Brenes, A Azofeifa y V. M. Jiménez. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48: 469-477.
- Wall M. E. y C. S. Fenske. 1961. Steroidal sapogenins. LXI. Steroidal sapogenin contents of seeds. *Economic Botany* 15: 131-132.
- Wojtyla L., K. Lechowska, S. Kubala y M. Garnczarska. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Frontiers in Plant Science* 66: 1-16.

Anexo I. Descripción botánica del género *Nolina* (Solano y Rivera-Lugo, 2012).

Rosetófilas arborescentes, dioicas o poligamodioicas.

Tallos con frecuencia muy gruesos y bien desarrollados, pero no ensanchados en la base, cubiertos con los restos de las hojas secas.

Hojas en rosetas sobre el ápice de las ramas, persistentes o deciduas, espiraladas, numerosas, lineares, erectas o arqueadas, ápice agudo, no fibroso en la madurez, margen serrulado. Inflorescencias terminales, espiciformes o panículadas, pedúnculos ocasionalmente muy reducidos; brácteas similares a las hojas, alargadas, marcadamente atenuadas, las brácteas fértiles, pequeñas, escariosas.

Flores generalmente 3-meras, pediceladas, pedicelos articulados, generalmente en la mitad o hacia la base; perigonio 6 tépalos, oblongos o elípticos-ovados, persistentes, tornándose escariosos; estambres 6, generalmente abortivos en flores femeninas; ovario 3-locular, profundamente 3-lobado, abortivo en flores masculinas; estilo muy corto o ausente, óvulos 2 por lóculo.

Frutos en cápsulas, 3-lobadas, 3-loculadas, infladas, indehiscentes.

Semillas 1, ocasionalmente 2-6, globosas a oblongas, ornamentación muriculada o reticulada a punctiforme, pardas.

Diversidad. Género con 21-30 especies, todas presentes en México.

Distribución. De Estados Unidos a Centroamérica.

Anexo II. Descripción botánica y clasificación taxonómica de la especie *Nolina parviflora*.

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Asparagales

FAMILIA: Nolinaceae

GÉNERO: *Nolina* Mich.

ESPECIE: *N. parviflora* (Kunth) Hemsl.

Rosetófilas arborescentes, 4.0-5.0 m alto. **Tallos** erectos, 10.0-20.0 cm diámetro, con 1-6 ramas. **Hojas** 150 a 200 por roseta, persistentes; láminas, 1.0 (-1.5) m largo, (0.8-) 1.0-1.5(-2.0) cm ancho, lanceoladas, base 5.0-6.0 cm largo, 4.0-5.0 cm ancho, ovada, ápice agudo, largamente atenuado, incurvado con la edad, margen denticulado, verde-amarillentas, haz y envés lisos. **Inflorescencias:** paniculadas erectas, 1.5-2.0 m de largo, pedúnculo 1.5-2.5 cm diámetro en la base, ramas primarias, 20-30 cm largo, numerosas, con pocas flores, hasta 5 botones por nudo, desarrollándose generalmente 2, fructificando sólo una; porción fértil, 1.0-1.5 m largo, brácteas en la parte media de la inflorescencia mayores de 30 cm largo, en el ápice hasta 15 cm largo, adpresas, foliáceas, angostas; pedicelos, 7-12 mm largo, articulados en el primer tercio próximo a la base, en ocasiones muy cerca de ésta. **Flores** unisexuales, tépalos libres, 2.5-3.0 mm de largo, 1.5-2.0 mm ancho, elípticos a ovados, los internos ligeramente de menor tamaño, blanquecinos, en ocasiones con máculas verdes o pardas, margen hialino; estambres fértiles 6, libres, más cortos que los tépalos, hasta 3.0 mm largo, filamentos de 2.0 mm de largo, anteras de 1.5 mm de largo; ovario 3-lobado, lóbulos redondeados en el ápice de 2 mm de largo, estigma 3-lobado, lóbulos de 1 mm de largo. **Frutos** en cápsulas de 0.7-1.0 cm de largo, 0.9-1.4 cm ancho, pericarpio delgado, lóbulos ovoidales a elipsoidales; **semillas** 1, 3.0-4.0 mm largo, 3.0-3.5 mm ancho, elipsoidales a ovoidales, reticuladas a punctiformes, pardas. **Fenología:** Florece de febrero a mayo. Fructifica de abril a noviembre.

Anexo III. Formulación y proporción de sales y componentes orgánicos presentes en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), 1962.

Macronutrientes	100% (gL⁻¹)	50% (gL⁻¹)	50% (macros, micros y sacarosa, gL⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.65	0.825	0.825
KNO ₃	1.9	0.95	0.95
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.37	0.185	0.185
KH ₂ PO ₄	0.17	0.085	0.085
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.44	0.22	0.22
Micronutrientes			
KI	0.00083	0.000415	0.000415
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031	0.0031
MnSO ₄ H ₂ O	0.01689	0.008445	0.008445
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.00025	0.000125	0.000125
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.000025	0.0000125	0.0000125
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000025	0.0000125	0.0000125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000025	0.0000125	0.0000125
Solución Hierro-EDTA			
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	0.0373	0.01865	0.0373
FeSO ₂ 7H ₂ O	0.0278	0.0139	0.0278
Vitaminas			
Acido nicotínico	0.0005	0.00025	0.0005
Piridoxina-HCl	0.0005	0.00025	0.0005
Tiamina-HCl	0.0001	0.00005	0.0001
Aminoácidos			
Inositol	0.1	0.05	0.1
Glicina	0.002	0.001	0.002
Sacarosa	30	15	15
Agar	8	8	8
pH	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8