



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación y perfil fitoquímico de *Habranthus
concolor* Lindl. (Amaryllidaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ALMA BRENDA SORIANO GARCÍA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. HELIA REYNA
OSUNA FERNÁNDEZ
CO-TUTOR: DR. RICARDO REYES CHILPA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Soriano
García
Alma Brenda
55 37 25 11 53
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310258867
2. Datos del tutor
Dra
Helia Reyna
Osuna
Fernández
3. Datos del co-tutor
Dr
Ricardo
Reyes
Chilpa
4. Datos del sinodal 1
Dr
Sol
Cristians
Niizawa
5. Datos del sinodal 2
Dra
Eva
Aguirre
Hernández
6. Datos del sinodal 3
Dra
Silvia Laura
Guzmán
Gutiérrez
7. Datos del trabajo escrito
Propagación y perfil fitoquímico de *Habranthus concolor* Lindl. (Amaryllidaceae)
135 p
2019

Agradecimientos

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos De Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT DGAPA UNAM):

IG210418: Química, Farmacología y Botánica de las plantas del Códice de la Cruz Badiano de 1552.

IN210016: Bioprospección de la flora mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral.

Al M. en C. E. Tapia del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural LANCIC-IQ-UNAM por su asistencia técnica en el análisis e interpretación de los espectros de masas.

Al Invernadero de la Facultad de Ciencias por brindar el espacio necesario en sus instalaciones para el mantenimiento de las plantas propagadas, en especial a la M. en C. Patricia Olguín por su accesibilidad y apoyo con el manejo de datos al interior de este espacio.

A la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín, por el apoyo con los recursos fotográficos incluidos en este trabajo.

A mis sinodales: al Dr. Sol Cristians Niizawa, la Dra. Eva Aguirre Hernández y la Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez, por el tiempo dedicado a la revisión de esta investigación y sus valiosos comentarios y propuestas para el mejoramiento de la misma. Así mismo, al M. en C. Gabriel Sinué Fonseca Salazar por su amabilidad al leer mi trabajo y las sugerencias aportadas.

Hago un especial agradecimiento a mi asesora, la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, por su paciencia, apoyo y asesoría a lo largo de todo este proceso. De igual manera, al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por la atención y el tiempo invertido para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco principalmente a mi familia por darme todo su amor y apoyo incondicional. A mi mamá, Yolanda García, por esforzarse cada día para que nada me faltara.

A todas las personas que he conocido a lo largo de mi vida, todas aquellas con quienes he tenido la dicha de compartir buenos y malos momentos, a partir de los cuales he aprendido y han contribuido a formar la persona que ahora soy. Especialmente a aquellos con los que he platicado y reflexionado sobre la vida, con quienes congenio para ser cada día un ser humano más consciente.

¡Infinitas gracias!

ÍNDICE

1 Resumen	7
2 Introducción	9
3 Antecedentes	11
3.1 Las plantas medicinales y sus usos	11
3.2 Enfermedad de Alzheimer	12
3.2.1 Medicamentos utilizados para tratar el Alzheimer	13
3.3 Familia Amaryllidaceae	15
3.3.1 Diferencias entre los géneros <i>Habranthus</i> y <i>Zephyranthes</i>	15
3.3.2 Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y especies de Amaryllidaceae ...	16
3.4 Clasificación taxonómica de <i>Habranthus concolor</i> (Tropicos, 2019)	17
3.4.1 Descripción botánica de <i>Habranthus concolor</i>	17
3.4.2 Estudios realizados en <i>Habranthus concolor</i>	19
3.5 Propagación sexual de plantas.....	21
3.5.1 Priming o acondicionamiento	24
3.6 Propagación asexual de plantas.....	26
4 Justificación.....	27
5 Hipótesis	27
6 Objetivos	28
6.1 Generales.....	28
6.2 Particulares	28
7 Materiales y métodos	29
7.1 Propagación sexual	29
7.1.1 Colecta de semillas	29
7.1.2 Morfofisiología.....	29
7.1.2.1 Peso y longitud	29
7.1.2.2 Contenido de humedad.....	29
7.1.2.3 Viabilidad con tetrazolio	30
7.1.2.4 Imbibición.....	31
7.1.3 Germinación y sobrevivencia	31
7.1.4 Velocidad de germinación	32
7.1.5 Almacenamiento	32

7.1.6 Priming o acondicionamiento	33
7.1.6.1 Control e hidropriming	33
7.1.6.2 Termopriming.....	33
7.1.6.3 Priming hormonal	33
7.1.6.4 Osmopriming.....	33
7.1.7 Fotoblastismo.....	34
7.2 Propagación asexual.....	34
7.2.1 Obtención del material	34
7.2.2 Medición y procesamiento de bulbos	35
7.2.3 Lavado y desinfección.....	36
7.2.4 Tratamientos utilizados	37
7.2.5 Siembra del material	39
7.3 Fitoquímica.....	40
7.3.1 Preparación de extractos metanólicos.....	40
7.3.2 Extracción de alcaloides.....	40
7.3.3 Análisis mediante cromatografía de capa fina (CCF)	41
7.3.4 Análisis del perfil alcaloideo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	41
7.4 Análisis estadístico.....	42
8 Resultados y discusión	43
8.1 Propagación sexual.....	43
8.1.1 Colecta de semillas y procesamiento	43
8.1.2 Morfofisiología.....	44
8.1.2.1 Peso y longitud	44
8.1.2.2 Contenido de humedad (peso seco)	44
8.1.2.3 Viabilidad con tetrazolio	45
8.1.2.4 Imbibición.....	46
8.1.3 Germinación de semillas recién colectadas y sobrevivencia	48
8.1.4 Almacenamiento	53
8.1.4.1 Contenido de humedad.....	53
8.1.4.2 Viabilidad con tetrazolio	54
8.1.4.3 Germinación.....	55
8.1.4.4 Velocidad de germinación	56
8.1.5 Priming o acondicionamiento	60
8.1.5.1 Velocidad de germinación	61

8.1.5.2 Sobrevivencia	62
8.1.6 Fotoblastismo.....	67
8.1.7 Fenología	69
8.2 Propagación asexual.....	71
8.2.1 Características de los bulbos	71
8.2.2 Análisis general de los tratamientos	71
8.2.2.1 Bulbos.....	72
8.2.2.2 Hojas.....	78
8.2.2.3 Raíces.....	82
8.2.2.4. Biomasa.....	85
8.2.2.5 Floración y fructificación.....	86
8.3 Fitoquímica.....	92
8.3.1 Cromatografía en capa fina.....	92
8.3.2 Análisis mediante CG-EM.	93
9 Conclusiones.....	111
10 Perspectivas.....	112
11 Referencias	113
12 Anexos	125

1 Resumen

Habranthus concolor (Lindl.) es una especie de la familia Amaryllidaceae, la cual se caracteriza por la presencia de alcaloides de gran interés medicinal, entre ellos destaca la galantamina, capaz de inhibir a la acetilcolinesterasa, enzima responsable de la degradación de la acetilcolina, neurotransmisor que se ve afectado en personas que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Se realizó la propagación de *H. concolor* a partir de un lote de semillas colectadas en junio de 2016 en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA). Se llevó a cabo la caracterización morfofisiológica del material vegetal recién colectado, obteniendo el peso de mil semillas ($4.13 \text{ g} \pm 9.3 \times 10^{-4} \text{ e.e.}$), así como el tamaño en su eje longitudinal ($9.75 \text{ mm} \pm 0.87 \text{ e.e.}$) y ecuatorial ($6.29 \text{ mm} \pm 0.49 \text{ e.e.}$). Se determinó el contenido de humedad inicial ($7.37\% \pm 0.77 \text{ e.e.}$), el porcentaje de viabilidad de las semillas (70%) y su respuesta germinativa. Se observó que en 14 días se alcanzó 96% de germinación; se determinó que son semillas permeables que no requieren métodos de escarificación.

Se almacenaron semillas de *H. concolor* durante 9 meses en tres condiciones de temperatura diferentes (8°C , -20°C y temperatura ambiente a $26^\circ\text{C} \pm 2.7$), evaluando cada tercer mes el contenido de humedad, viabilidad y porcentaje de germinación. El almacenamiento a temperatura ambiente demostró ser aquel que mantenía más bajos los porcentajes de humedad (inferior al 4.5%), alto poder germinativo (96%) así como mantenimiento de la viabilidad de los embriones, además de ser económico y práctico de realizar. Se determinó que las semillas de *H. concolor* son ortodoxas y se evaluó su respuesta fotoblástica bajo diferentes condiciones lumínicas (luz roja, rojo lejano, luz blanca y obscuridad) resultando semillas fotoblásticas indiferentes debido a los altos porcentajes germinativos alcanzados en todas las condiciones (superiores al 92%).

Se evaluaron distintos tipos de acondicionamiento: hidropriming (22°C) termopriming (8 y 34°C) hormopriming (auxinas y giberelinas 50 y 100 ppm) así como osmopriming (manitol a -3 y -6 atm) y el control (imbibición con agua a temperatura ambiente sin secado). Los tratamientos aplicados no

incrementaron el máximo poder germinativo alcanzado tras 10 días de siembra, por lo que se infiere las semillas colectadas provenían de acondicionamiento natural; sin embargo, se evaluó la velocidad de germinación así como la sobrevivencia de las plantas después de año y medio, identificando los tratamientos de hidropriming y osmopriming (-6 atm), los que indujeron una mayor velocidad de germinación y porcentajes de sobrevivencia (52%).

Se realizó la propagación asexual a partir de dos grupos de bulbos diferentes, Invernadero 2010, con bulbos más pequeños y Rescate 2017, con bulbos más grandes, de 21.81 g y 48.75 g, respectivamente. Se evaluaron distintos tipos de corte al bulbo de *H. concolor*, así como la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal (AIB a 1500 ppm) observando que la formación de nuevos bulbillos estuvo determinada por el daño a la yema apical y el desarrollo de las yemas laterales. El corte que produjo más de 4 bulbillos fue el corte de escamas externas sin AIB; sin embargo, a mayor cantidad de bulbos producidos, fue menor el tamaño de los mismos, ya que el crecimiento depende de la cantidad de reservas contenidas en el fragmento inicial.

Finalmente, se evaluó la presencia y tipos de alcaloides (CCF y CG-EM, respectivamente) en distintos órganos de *H. concolor*: bulbos, túnica, hojas, raíces, escapo floral fresco y seco y semillas, identificando en todas las muestras la galantamina como compuesto mayoritario. Se determinó la presencia de otros alcaloides, como la metil-apogalamina, clidantina, epi-galantamina, licoramina, licorina y narwedina.

2 Introducción

Las plantas han constituido una fuente innumerable de recursos que el ser humano ha utilizado a lo largo de la historia. Han sido empleadas para la alimentación tanto en seres humanos como de la mayoría de los seres vivos en el planeta. El conocimiento de las plantas ha ido en aumento aprendiendo a emplearlas en distintos sectores, como por ejemplo en la elaboración de perfumes y saborizantes, el uso de resinas, uso de madera en la carpintería y construcción, para la producción de celulosa y papel, la obtención de fibras textiles, apreciadas por su valor ornamental, inclusive han sido utilizadas para la obtención de medicinas para tratar diferentes problemas de salud (Álvarez, 2014).

Las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, los cuales están clasificados en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos secundarios aparentemente no tienen una función directa en su crecimiento y desarrollo, ya que no hay una relación directa de estos compuestos con los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas o en la formación de metabolitos primarios de la planta (carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos). Estas sustancias tienen distribución restringida, encontradas sólo en algunas plantas o grupos de especies relacionados, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todas las plantas (Bruneton, 2001; Taiz y Zeiger, 2010).

Presuntamente se asume que la producción y acumulación de metabolitos secundarios contribuyen a la sobrevivencia del organismo en el medio que se desarrolla, defendiendo a las plantas contra una variedad de patógenos y depredadores, o bien favoreciendo relaciones simbióticas entre distintos organismos; así como la atracción de polinizadores y dispersión de semillas (Karlovsy, 2008; Taiz y Zeiger, 2010). Los metabolitos secundarios se pueden dividir principalmente en tres grandes grupos: terpenoides, compuestos fenólicos y nitrogenados (como los alcaloides) (Taiz y Zeiger, 2010).

Una característica peculiar de la familia Amaryllidaceae es la presencia de un cierto grupo de alcaloides, los cuales han sido aislados en todos los géneros. A partir del aislamiento de la licorina, el

primer alcaloide obtenido de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, la investigación en esta familia continuó con el paso del tiempo debido a las relaciones biogénicas (Bastida *et al.*, 2011).

Los alcaloides de la familia Amaryllidaceae poseen gran actividad biológica. Entre sus propiedades farmacológicas destacan las antivirales, antitumorales así como inhibidores de la acetilcolinesterasa (López *et al.*, 2002; Bastida *et al.*, 2006). La galantamina es el alcaloide más importante en la familia, que se usa ampliamente para tratar la enfermedad de Alzheimer, al ser un inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa (Howland, 2010; Ago *et al.*, 2011).

Se ha reportado la presencia de galantamina y otros alcaloides en *H. concolor* (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011; Centeno, 2014) por lo que esta especie representa una alternativa para su obtención. Sin embargo, el uso adecuado y sustentable requiere del conocimiento de sus características morfológicas y fisiológicas para proponer así métodos de propagación que permitan reproducir a la especie, conociendo su perfil fitoquímico y la evaluación de su posible uso en la elaboración de fitomedicamentos.

3 Antecedentes

3.1 Las plantas medicinales y sus usos

México es un país de gran diversidad biológica. Existen plantas que se usan para diversos fines, tanto del orden alimenticio, como forrajero, ornamental o medicinal (Aguilar y Camacho, 1985). Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional popular mexicana y han representado desde siempre una alternativa a otro tipo de recursos para la salud (Aguilar y Camacho, 1985; Aguilar *et al.*, 1994).

El uso de las plantas con fines medicinales es seguramente igual de antiguo como el hombre, pues su empleo se remonta desde el principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban (Hernández y Gally, 1989; Lara y Márquez, 1996).

El empleo de las plantas se da tanto en países pobres, en el que la fitoterapia constituye la forma de tratamiento más económica y practicada en la cultura popular, así como en países altamente industrializados; donde a partir de material vegetal se obtienen los medicamentos o bien, a partir de semisíntesis (Lara y Márquez, 1996). Durante el siglo XIX y los primeros 60 años del siglo pasado, el pensamiento neopositivista daba por hecho que los problemas de salud de la población tendrían su solución en los medicamentos químico-farmacéuticos. Sin embargo, al paso del tiempo se fue descubriendo que los medicamentos eran insuficientes para atender los problemas prioritarios de salud; sus costos cada día eran más altos e inalcanzables por amplios sectores de la población ya que eran muy pocos los medicamentos nuevos que se descubrían y un alto porcentaje de éstos seguían dependiendo de las plantas medicinales para su producción (Tortoriello, 2005).

En México, 99% de las plantas utilizadas son de recolección silvestre por lo que es necesario crear un programa de propagación a nivel nacional para proveer de materia prima vegetal en cantidades

suficientes según la demanda, y evitar con ello la depredación y exterminio de especies (Osuna *et al.*, 2005).

El estudio de los productos naturales ha proporcionado una amplia gama de insumos bioactivos prototipo para la formulación de fármacos, trayendo consigo grandes ventajas, como gran actividad biológica y baja toxicidad celular (Lara y Márquez, 1996), por lo que el uso e investigación de plantas medicinales para tratar problemas de salud, hoy en día, debe seguir siendo una alternativa de tratamiento, para lograr así la producción de fitomedicamentos, hechos a partir de extractos vegetales estandarizados y regulados (Osuna *et al.*, 2005) con la finalidad de atender diferentes enfermedades que aquejan a la población. Uno de los problemas de salud que afecta a las poblaciones en México y el mundo es el caso de la enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés).

3.2 Enfermedad de Alzheimer

La demencia es un síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad de realizar actividades de la vida diaria; siendo una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores (OMS, 2016). Existen diferentes tipos de demencia y en el mundo entero hay unos 46.8 millones de personas que la padecen. Se proyecta que este número se duplique cada 30 años, alcanzando 72.7 millones en el 2030 y los 131.2 millones en el 2050. La enfermedad de Alzheimer, es la causa de demencia más común, acaparando entre un 60 y 70% de los casos (Alzheimer's Disease International, 2015; OMS, 2016).

Alois Alzheimer fue un neurólogo alemán, que estudió el caso de una paciente llamada Auguste D., quien en 1901 ingresó al hospital Frankfurt con signos de demencia; años más tarde muere y Alzheimer, a partir de cortes histológicos del cerebro de Auguste reporta la descripción neuropatológica encontrada. Posteriormente, en 1910, Emil Kraepelin da el nombre de Enfermedad de Alzheimer a partir de las investigaciones realizadas por el neurólogo alemán (Alpizar-Quesada y Morales-Alpiza, 2003; Fuentes, 2003).

La AD es un desorden neurodegenerativo fatal y progresivo, que se manifiesta con deterioro cognitivo y de la memoria, afectando las actividades de la vida diaria con una variedad de síntomas neuropsiquiátricos y trastornos conductuales (Cummins, 2004).

Con base en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en México, más de 350,000 personas están afectadas por AD y mueren anualmente 2,030 pacientes. En Estados Unidos hay 4 millones y mueren anualmente más de 100,000, convirtiendo a la enfermedad de Alzheimer en la cuarta causa de muerte entre adultos. Se estima que uno de cada tres de nosotros enfrentará esta enfermedad en algún ser querido o en un familiar (Reséndiz, 2010).

Con base en un cálculo realizado en el 2010 por el psiquiatra mexicano David Rasnikov, especialista del padecimiento en México, estima que el gasto en un paciente que padece Alzheimer es de 12 mil pesos mensuales, el cual es asumido completamente por las familias. El costo mayor de las personas que padecen DA es la toma de fármacos, así como el uso de productos y artefactos de cuidado para el paciente (pañales, sillas de ruedas, etc.) (Flores, 2010).

La DA es un problema de gran impacto socio-económico, en continua progresión, y estrechamente relacionada con el proceso de envejecimiento, a medida que aumentan la calidad y expectativas de vida en nuestras sociedades avanzadas (Bautista, 2014).

3.2.1 Medicamentos utilizados para tratar el Alzheimer

Actualmente existen distintos medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) utilizados para tratar a las personas que han sido diagnosticadas con la DA. El empleo de estos tratamientos coadyuva los síntomas de la enfermedad, brindando a los pacientes bienestar, dignidad e independencia por un período más largo de tiempo, además de apoyar a las personas encargadas de cuidarlos (Alzheimer's Disease Medications, 2018).

Existen medicamentos que ayudan en etapas tempranas a moderadas, así como avanzadas de la enfermedad, sin embargo, aunque el empleo de estos fármacos contribuye a controlar los síntomas de este padecimiento, ninguno la detiene. Estas sustancias son llamadas “inhibidores de colinesterasa”, las cuales se prescriben para tratar los síntomas de grado leve a moderado de la AD. Estos medicamentos pueden ayudar a retrasar los síntomas o impedir que empeoren por un tiempo limitado y controlando algunos síntomas relacionados al comportamiento, los utilizados principalmente son: Razadyne® (galantamina), Exelon® (rivastigmina) y Aricept® (donepezilo) (Howland, 2010; Alzheimer’s Disease Medications, 2018; BrightFocus® Foundation, 2018).

La galantamina, es un alcaloide, inhibidor de acción prolongada, selectivo, reversible y competitivo de la acetilcolinesterasa, enzima responsable de la degradación de acetilcolina. La galantamina actúa en el sistema nervioso central y logra unirse al sitio activo de la acetilcolinesterasa, por lo cual, este compuesto es efectivo para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, tales como DA (Bastida *et al.*, 2011). Este alcaloide comercializado bajo el nombre de Razadyne®, a corto plazo mejora actividades de cognición, función y actividades de la vida diaria, cuestiones que se ven afectadas por DA, sin embargo, algunos de los efectos secundarios que los pacientes enfrentan son: náusea, vómito, diarrea, dolor de cabeza, entre otros (BrightFocus® Foundation, 2018).

La galantamina ha sido obtenida de la extracción del narciso (*Narcissus pseudonarcissus* L.) perteneciente a la familia Amaryllidaceae, sin embargo es extremadamente cara para uso clínico (~\$50,000/kg) (Shieh y Carlson, 1994), por lo que para la producción de este fármaco se ha desarrollado su síntesis total, mediante la forma racémica o en la forma pura enantiomérica (Marco-Contelles *et al.*, 2006).

La exploración de otras fuentes vegetales para la obtención de compuestos químicos con interés médico, representa una alternativa para tratar enfermedades como el Alzheimer. En la ciencia existen diferentes criterios para abordar la investigación y selección de plantas que pueden ser utilizadas para

el desarrollo de medicamentos, como lo son: el criterio ecológico, selección al azar, quimiotaxonómico y etnomédico. Entre ellos el quimiotaxonómico, consiste en el conocimiento de las relaciones filogenéticas de los diferentes taxa, así como las rutas biosintéticas mediante las que se forman los metabolitos secundarios, como ocurre en las especies de la familia Amaryllidaceae (Abreu y Cuéllar, 2008).

3.3 Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae pertenece al orden Asparagales, la cual se subdivide en 3 subfamilias Amaryllidoideae, Agapanthoideae y Allioideae (Chase *et al.*, 2009). La familia cuenta con una característica muy particular, que es la consistente presencia de un grupo exclusivo de alcaloides, los cuales han sido aislados de plantas de todos los géneros de esta familia. El primer alcaloide aislado en esta familia fue la licorina, presente en *Narcissus pseudonarcissus* en 1877; actualmente más de 300 alcaloides han sido aislados de esta familia (Bastida *et al.*, 2011). Específicamente, la subfamilia Amarylloideae se caracteriza por sintetizar un gran número de alcaloides estructuralmente diversos, que presentan actividad antitumoral, antiviral, antimalárica, inhibidora de la acetilcolinesterasa, e inmunoestimulante (Lizama, 2017).

Dicha familia tiene una amplia distribución y está representada en los trópicos, con centros importantes de diversidad en Sudáfrica, Sudamérica (los Andes) en y en el Mediterráneo, agrupando alrededor de 860 especies en 50 géneros (López-Ferrari y Espejo-Serna, 2002). Es una familia predominantemente hortícola. En los géneros *Galanthus* y *Narcissus* se han observado alcaloides de interés medicinal (Cabral, 2000).

3.3.1 Diferencias entre los géneros *Habranthus* y *Zephyranthes*

Habranthus y *Zephyranthes* son dos géneros de la familia Amaryllidaceae. La delimitación del género *Habranthus* con respecto a *Zephyranthes* es controvertida debido a la similitud en la estructura floral, ocurrencia simpátrica y falta de caracteres satisfactorios para separar ambos géneros. Las diferencias

principales ocurren en la simetría de la flor y la longitud de los estambres, ya que *Zephyranthes* se caracteriza por tener flores actinomorfas y erectas, con estambres erectos de la misma longitud; mientras que *Habranthus* tiene flores zigomorfas, declinadas y estambres en diferentes longitudes (Dutilh y Oliveira, 2005; Amaral-Lopes y Barbosa 2015). Particularmente la especie *Habranthus concolor*, incluida en este trabajo, ha sido transferida al género *Zephyranthes* (Bentham y Hooker, 1883; Flagg *et al.*, 2018). Sin embargo, los análisis filogenéticos muestran un alto grado de reticulación entre ambos géneros (García *et al.*, 2017), y por ahora no existe una clasificación formal basada en dichos análisis. Por lo tanto, este trabajo retoma la propuesta de Villaseñor (2016) quien reconoce a esta especie como *H. concolor*.

3.3.2 Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y especies de Amaryllidaceae

Se ha reportado la presencia de diferentes especies de la familia Amaryllidaceae en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), como es el caso de: *Habranthus concolor* (Lindl.), *Sprekelia formosissima* (L.) Herb., *Zephyranthes fosteri* Traub, *Zephyranthes longifolia* Hemsl, *Zephyranthes sessilis* Herb y *Habranthus aff. concolor* (Rojo y Rodríguez, 2002; Castillo *et al.* 2007; Damián-Domínguez, 2010; Centeno, 2014).

Los pedregales, en sus diferentes fases de intemperización presentan un particular interés biológico ya que, por lo general, contienen una inmensa riqueza de vida vegetal y animal, particularmente en términos de diversidad, debido a la gran cantidad de microambientes que ofrecen las irregularidades de la superficie rocosa, sus grietas, oquedades y riscos (Rojo y Rodríguez, 2002).

Durante mucho tiempo la vegetación del Pedregal de San Ángel mantuvo un buen estado de conservación, pero en la segunda mitad del siglo XX el desarrollo urbano de la Ciudad de México alcanzó el área del pedregal, iniciando así un proceso rápido e intenso de destrucción y fragmentación de sus sistemas ecológicos, por lo que hoy la mayor parte de la corriente de lava está cubierta de

casas, edificios y calles, trayendo consigo la desaparición de su flora y fauna nativas (Rojo y Rodríguez, 2002; Castillo-Agüero *et al.*, 2004).

Debido al deterioro constante que se ha producido en el ecosistema, es importante conservar las especies que se encuentran presentes en la Reserva, como es el caso de *H. concolor*. Conociendo el potencial químico que tiene esta planta, es de vital importancia el desarrollo de protocolos de propagación que permitan generar los recursos vegetales requeridos para la elaboración de fitomedicamentos, apegados a un buen control de calidad. Dicho protocolo ayudará a evitar que los individuos de la especie se vean amenazados por la recolección silvestre, evitando poner en riesgo las poblaciones, y en general el equilibrio del ecosistema en el cual estén presentes.

3.4 Clasificación taxonómica de *Habranthus concolor* (Tropicos, 2019)

Clase Equisetopsida C. Agardh

Subclase Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden Lillanae Takht.

Orden Asparagales Link

Familia Amaryllidaceae

Género *Habranthus* Herbert 1824

Especie *H. concolor* Lindl. 1838

Nombres comunes: Mayitos, flor de mayo, Lily rain.

3.4.1 Descripción botánica de *Habranthus concolor*

Habranthus es un género de la familia Amaryllidaceae, tiene entre 30 y 40 especies distribuidas desde el sureste de Estados Unidos, México y América del Sur. Los representantes del género se caracterizan por la presencia de bulbos perennes, hojas anuales, brácteas fusionadas, flores zigomórficas y estambres en cuatro longitudes diferentes (Amaral-Lopes y Barbosa 2015).

La siguiente descripción botánica corresponde a la elaborada por Calderón y Rzedowski (2001) donde describe a *Habranthus concolor* (referida en la obra como *Zephyranthes concolor*) con las siguientes características:

Hierba de hasta 50 cm de largo; bulbo ovoide, de 1.5 a 4.5 cm de diámetro; tallos 1 ó 2, de 10 a 40 cm de longitud, de color verde oscuro, ligeramente glaucos, con tonos rojizos sobre todo hacia el tercio inferior, estriados; hojas tardías, desarrolladas en la etapa de fructificación, láminas de 10 a 40 cm de largo por 2.5 a 5.5 (7.5) mm de ancho, agudas, vainas membranosas, formando una cubierta externa hasta de 9 cm de longitud; pedúnculo hasta de 7 cm de largo, bráctea de 2,5 a 5 cm de largo, de color blanco, con tintes verdosos y/o rosados, especialmente distribuidos en la porción media y apical de la cara exterior de los segmentos del perianto, tubo inconspicuo, de 3.5 a 5 mm de longitud, segmentos de la serie externa oblanceolados, de 4.2 a 5 cm de largo por 12 a 22 mm de ancho, ápice agudo y piloso, cuneados en la base, los de la serie interna similares, de 8.5 a 16 mm de ancho; anteras lineares, de 7 a 10 mm de longitud; cápsula de 1.3 a 1.7 cm de longitud, trilobulada, verde, a menudo con tonos rojizos, de color paja al tiempo de la dehiscencia; semillas semicirculares, de 7 a 9 mm de largo por 4 a 5.5 mm de ancho, planas (Fig. 1). Dicha especie se encuentra distribuida en los estados de Aguascalientes, Ciudad de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas (Villaseñor, 2016) y Durango (Soriano-García, *Com. pers.*, 2019) en zonas de matorral xerófilo y altitudes de 2250 a 2500 msnm (Damián-Domínguez, 2010).



Figura 1. *Habranthus concolor*. **a)** Flor con simetría radial y tépalos blancos con tintes verdosos al interior. **b)** cápsula con semillas. **c)** Fruto inmaduro con restos de flor. (Foto: Soriano-García, 2019).

3.4.2 Estudios realizados en *Habranthus concolor*

Damián-Domínguez (2010), describe la fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus* aff. *concolor* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, mostrando que ambas especies pasan por nueve fenofases: brote, botón joven, botón maduro, flor joven, flor madura, flor sésil, fruto temprano, fruto joven y fruto maduro. Se observó que la duración del botón joven, la flor madura y el fruto maduro fue significativamente mayor en *H. concolor* que en *H. aff. concolor*. Se registró una alta sincronía en los picos de floración de ambos taxa, siendo la precipitación el disparador ambiental que promueve la aparición de brotes en ambos, donde *H. concolor* requiere niveles de al menos 30 mm de precipitación, mientras que *H. aff. concolor* requiere niveles menores. En un experimento de riego se

observó que la aparición de brotes en *H. concolor* ocurre en un promedio de 3.5 días después de una lluvia intensa.

Reyes-Chilpa *et al.*, (2011) aislaron los alcaloides presentes en los bulbos y las partes aéreas de *Z. concolor*, los cuales fueron caracterizados mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, como: clidantina, galantamina, N-óxido de galantamina, licorina, galwesina y epinorgalantamina. Adicionalmente, dichos metabolitos fueron probados como inhibidores de la acetilcolinesterasa. Se observó que la clidantina y N-óxido de galantamina inhiben la acetilcolinesterasa en el modelo de la anguila eléctrica *in vitro*, siendo cinco veces menos potentes que la galantamina. La actividad inhibitoria de la replicación en el VIH-1 y la citotoxicidad de los alcaloides aislados, fueron evaluados en células humanas MT-4, mostrando que tenían escasa actividad biológica, comparado con fármacos estándar anti VIH, sin presentar citotoxicidad.

Centeno (2014) realizó el estudio anatómico y químico de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor*, describiendo y comparando los perfiles alcaloideos en los extractos metanólicos y la fracción alcaloidea del escapo, bulbo y las hojas de las especies. Se lograron caracterizar los alcaloides licorina y 3'-demetoximesembranol en *Z. fosteri*; galantamina y clidantina en *H. concolor*; licorina y un alcaloide no caracterizado en *H. aff. concolor*. En esta investigación se evaluó la capacidad de los extractos metanólicos y fracciones alcaloideas en la inhibición de la acetilcolinesterasa, para determinar el potencial como fitofármaco en el tratamiento de Alzheimer, encontrándose que *Z. fosteri* tiene mayor actividad inhibitoria, seguida por *H. concolor* y finalmente *H. aff concolor*.

Con base en la búsqueda bibliográfica realizada, no se encontró ningún reporte que aborde el protocolo de propagación que permita cultivar *H. concolor*, ya sea sexual o asexualmente; sin embargo, sí se encontraron reportes de plantas del género *Habranthus* y *Zephyranthes*, como los que se enuncian a continuación:

Echeverría y Alonso (2010) evaluaron la aptitud germinativa, el régimen de incubación y el crecimiento de hojas y bulbos de semillas de *Habranthus gracilifolius*. Se determinó que las semillas son fotoblásticas neutras y presentaron de nula a escasa dormición innata ya que germinaron casi en su totalidad. A temperaturas de 20°C y 10°/20°C, las semillas obtuvieron un poder germinativo superior al 75%, mientras que a 20°/30°C la germinación fue más lenta. Las plántulas mostraron hojas de otoño a finales de la primavera, perdiéndolas en verano. Los bulbos de *H. gracilifolius* crecieron linealmente 0.049 mm/día, encontrando que la especie necesita más de un año para alcanzar el estadio reproductivo.

Padilla-Sánchez *et al.*, (2016) evaluaron la propagación vegetativa y por semilla de *Z. fosteri* y *Z. lindleyana*, induciendo la producción de bulbillos mediante diferentes cortes al bulbo madre. Se generaron de 1.2 a 9.1 bulbos, obteniendo mayor cantidad de bulbos cuando más pequeño era el fragmento inicial. El tratamiento que generó mayor cantidad de bulbillos fue el corte transversal y longitudinal, separando la parte basal en dos grupos de escamas. A su vez, se propagaron mediante semillas, empleando charolas de poliestireno de 200 cavidades, depositando las semillas a 0.5 cm de profundidad con sustrato de agrolita y tierra de monte (proporción 2:3). Se encontró que los bulbos obtenidos mediante propagación asexual fueron de mayor tamaño que los obtenidos mediante semilla.

3.5 Propagación sexual de plantas

La propagación de plantas implica el control de dos tipos de desarrollo del ciclo biológico diferentes, sexual y asexual. Para propagar las plantas con éxito es necesario conocer los procedimientos mecánicos y técnicos, y saber la estructura y la forma en la cual se desarrollan los individuos de interés (Hartman y Kester, 1987).

La reproducción sexual implica la unión de células sexuales masculinas y femeninas, la formación de semillas y la creación de una población de plántulas con genotipos nuevos y diferentes (Hartman y

Kester, 1987). La siembra de la semilla es el inicio físico de la propagación, por lo que es importante tomar en cuenta las etapas por las cuales debe pasar una semilla después de desprenderse del fruto, para poder formar un individuo nuevo.

Después de la fecundación, la semilla realiza un proceso de desarrollo, el cual concluye con la reducción de su metabolismo y su deshidratación; posteriormente, la semilla se separa de la planta madre con estructuras funcionalmente autónomas, provistas de mecanismos bioquímicos que le permiten percibir el ambiente físico y germinar únicamente en condiciones adecuadas para el establecimiento y crecimiento de la plántula (Márquez, *et al.*, 2013).

La germinación de semillas puede ser definida como una serie de acontecimientos metabólicos y morfogenéticos que tienen como resultado la transformación de un embrión, en una plántula y el posterior desarrollo a una planta adulta. Cuando una semilla seca viable (que no se encuentra en latencia) tiene las condiciones adecuadas de agua y temperatura, se pone en marcha el proceso germinativo, el cual consiste en tres fases (Barceló *et al.*, 2001).

La fase I se caracteriza por una toma rápida inicial de agua, causada por el potencial hídrico de la semilla que es más bajo que el de medio externo (Fig. 2). La entrada de agua en esta fase puede producir algunas perturbaciones estructurales temporales, particularmente en las membranas, lo que provoca una rápida e inmediata salida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular, sin embargo, al poco tiempo las membranas recuperan su configuración estable, deteniendo la salida de solutos (Pérez, 2017).

La imbibición es un proceso físico que no tiene relación con la viabilidad de las semillas. La entrada de agua en el interior de las semillas da lugar a una dispersión de los coloides necesaria para la vuelta a la vida activa; rehidrata las reservas alimenticias, que sólo pueden transformarse en sustancias asequibles al embrión en presencia de agua, además los sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis de las sustancias de reserva sólo se activan en presencia de agua. En éste primer paso, la

imbibición está determinada por tres factores: composición química de la semilla, permeabilidad de la cubierta seminal y la disponibilidad de agua en el ambiente (Barceló *et al.*, 2001).

La fase II es un estado de meseta, donde ocurren los principales acontecimientos metabólicos que conducen a la emergencia de la radícula de las semillas no latentes (las semillas latentes también son activas metabólicamente en esta fase) (Fig. 2) (Pérez, 2017).

Sólo las semillas aptas para germinar entran en la fase III, en la que tiene lugar un nuevo incremento en la toma de agua y se da la elongación de la radícula (Fig. 2) (Giménez *et al.*, 1993; Barceló *et al.*, 2001).

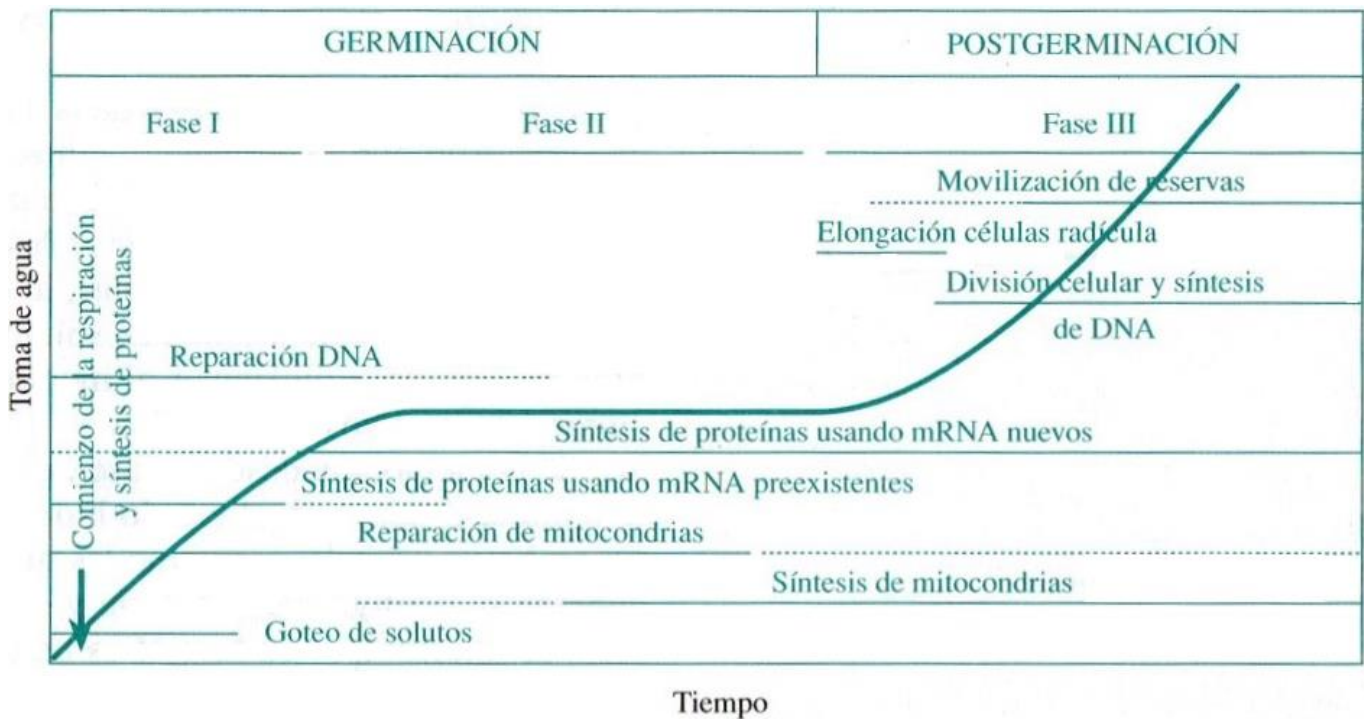


Figura 2. Principales acontecimientos asociados con la germinación y subsecuente crecimiento postgerminativo (Bewley, 1997).

3.5.1 Priming o acondicionamiento

Existen diferentes métodos encaminados al mejoramiento fisiológico de las semillas, con la finalidad de optimizar el comportamiento germinativo de las mismas. Uno de ellos es el priming, el cual consiste en la hidratación y posterior deshidratación de las semillas postcosecha y antes de la siembra (Sánchez *et al.*, 2001), lo cual mejora el desempeño de las semillas y tiene grandes ventajas, la principal, acelerar la germinación (Bazzigalupi *et al.*, 2013).

Una semilla tratada con priming acorta la segunda fase de imbibición, de reactivación metabólica y se expresa en una mayor velocidad de germinación y en un incremento en la velocidad y uniformidad de la emergencia y establecimiento de las plántulas (Barceló *et al.*, 2001). La imbibición y secado es una técnica que se fundamenta en el conocimiento del proceso de absorción de agua que tiene lugar durante la germinación (Giménez *et al.*, 1993) (Fig. 3). Si la imbibición se interrumpe puede ser desecada nuevamente hasta recuperar su contenido inicial de humedad, sin que se presenten daños. Estas semillas se denominan “semillas acondicionadas”, capaces de germinar rápidamente cuando sean sembradas (Giménez *et al.*, 1993).

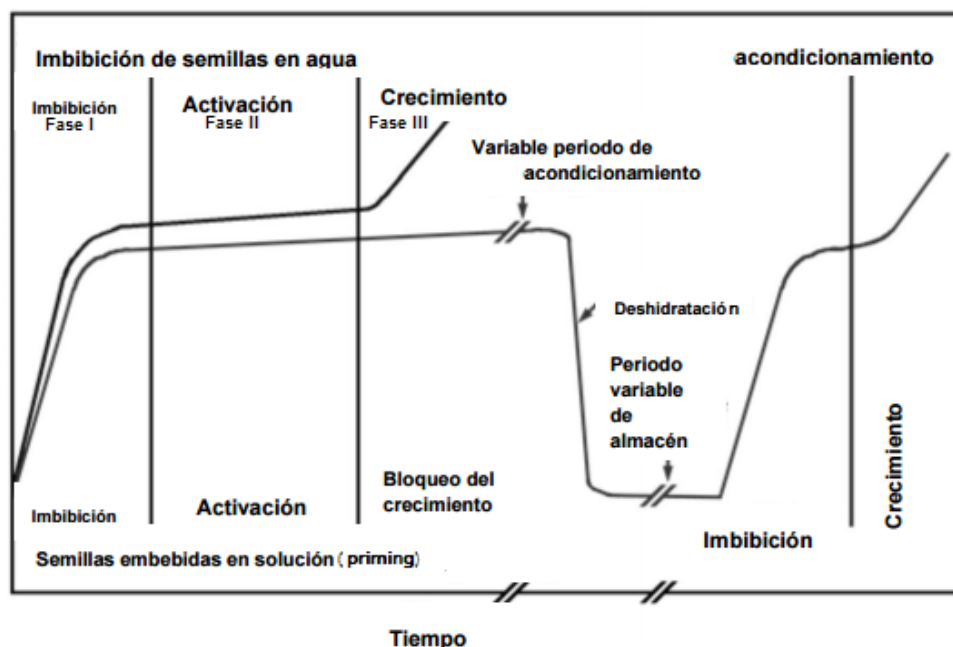


Figura 3. Imbibición, activación y germinación de semilla con y sin tratamiento de priming, línea inferior y línea superior, respectivamente (Méndez, 2014). Modificado Soriano-García (2019).

Durante el priming se producen, entre otros procesos, liberación de inhibidores, reparación de daños de membrana provocados por radicales libres, degradación de reservas y construcción de nuevas enzimas necesarias durante la imbibición (Copeland y McDonald, 1995). Existen diferentes tipos de priming, los cuales se diferencian por emplear diversas sustancias para acondicionar las semillas antes de la siembra, entre ellos destacan:

El **hidropriming** implica el remojo de las semillas en agua, previa a la siembra. Este tratamiento permite que la semilla absorba agua, pasando por la primera fase de germinación e iniciando la actividad metabólica, mientras que las dos últimas fases se inhiben, evitando así la emergencia de la radícula (McDonald, 2000 en: Black y Bewley, 2000; Pill y Necker, 2001; Nawaz *et al.*, 2013). Posteriormente se da una reducción en el contenido de humedad de la semilla y se mantiene en equilibrio con el ambiente, hasta el momento de la siembra (Bazzigalupi *et al.*, 2013).

El **termoprimg**, consiste en la imbibición a diferentes temperaturas y posterior secado. Las temperaturas frías en la imbibición de las semillas permite que se desarrollen más en comparación con las embebidas a altas temperaturas que pueden bloquear la germinación. Se da un cambio en la expresión de genes codificantes de enzimas involucradas con la producción de ABA, GA y etileno, los cuales están relacionadas en la regulación de dormancia y germinación (Bewley *et al.*, 2013).

El **priming hormonal u hormoprimg** es el tratamiento previo que se le da a las semillas con diferentes hormonas, por ejemplo, ácido salicílico, auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, entre otros, promoviendo el desarrollo de las semillas y la posterior aplicación de secado evitando la emergencia radicular (Nawaz *et al.*, 2013).

El **osmoprimg o acondicionamiento osmótico** consiste en realizar una hidratación de las semillas en una solución acuosa con un potencial osmótico conocido. El proceso debe realizarse de tal forma que permita a las semillas absorber suficiente volumen de agua para activar el metabolismo, sin que

llegue a producirse anoxia. La absorción de agua se detiene en el momento en que se igualan las concentraciones osmóticas que desencadenan la absorción inicial de agua por parte de las semillas a través de sus tegumentos, ese momento coincide con la fase II de la germinación, donde el proceso se detiene, antes de la protrusión de la radícula (Giménez *et al.*, 1993).

3.6 Propagación asexual de plantas

La propagación asexual consiste en el uso de partes vegetativas de los individuos, empleando fragmentos de los mismos, esto es posible ya que cada célula de la planta madre mantiene la información genética necesaria para regenerar a un organismo por completo, gracias al principio de totipotencia que mantienen las células vegetales (Cásseres, 1980; Hartmann y Kester, 1987).

Existen tres variantes en la propagación vegetativa: 1) propagación por partes vegetativas como rizomas, estacas, bulbos, tubérculos, estolones y segmentos de órganos como tallos y hojas; 2) propagación por injertos, donde fragmentos de alguna planta se adhieren a otra receptiva con mayor resistencia o mejores características, y 3) propagación por cultivo de tejidos o *in vitro*, en la que pequeños fragmentos de tejido u órganos son reproducidas en condiciones de laboratorio completamente controladas (Vásquez *et al.*, 1977; Irigoyen y Vela, 2005).

La propagación vegetativa es de gran utilidad cuando se quiere preservar las características de la planta madre, por obtener individuos idénticos, manteniendo características como la productividad, tolerancia al estrés biótico, cierta resistencia a patógenos, o condiciones ambientales difíciles. También se emplea cuando se busca preservar genotipos de interés; cuando la planta no produce semillas, o éstas son de mala calidad. Una ventaja importante de este tipo de reproducción es el control en el crecimiento de las plantas, acortando ciclos reproductivos en el desarrollo de un individuo, evitando prolongados periodos juveniles y alcanzando en menor tiempo la madurez (Hartmann y Kester, 1987; Rojas *et al.*, 2004). La desventaja principal de la propagación asexual, es la dispersión de bacterias y

virus, ya que al utilizar fragmentos de planta contaminados, el material propagado contendrá dichas enfermedades (Rojas *et al.*, 2004).

4 Justificación

Dadas las altas incidencias de personas que padecen y se estima padecerán Alzheimer en las próximas décadas, así como los elevados costos involucrados en el tratamiento de la enfermedad, se hace indispensable la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para obtener galantamina, por lo que la propagación de esta especie se vuelve indispensable para generar éste u otros alcaloides relacionados; necesarios para la elaboración de fitomedicamentos.

5 Hipótesis

Si *H. concolor* presenta semillas ortodoxas, el almacenamiento de éstas permitirá mantener el porcentaje de humedad, germinación y viabilidad a través del tiempo.

El acondicionamiento o priming incrementará los porcentajes de germinación, velocidad y sobrevivencia en comparación con las semillas control.

El daño a la yema apical en los bulbos *H. concolor* mediante distintos cortes, terminará con la dominancia apical permitiendo el desarrollo de las yemas laterales y con esto la formación de nuevos bulbillos.

El análisis fitoquímico de *H. concolor* mostrará la presencia de alcaloides de interés médico, principalmente la galantamina.

6 Objetivos

6.1 Generales

- Establecer las condiciones óptimas de propagación (sexual y asexual) de *H. concolor*.
- Obtener e identificar los alcaloides extraídos de diferentes órganos de *H. concolor* mediante CG-EM.

6.2 Particulares

- Evaluar las características morfofisiológicas de *H. concolor*: peso, longitud, contenido de humedad, viabilidad y permeabilidad.
- Evaluar la respuesta al almacenamiento de semillas de *H. concolor*.
- Evaluar la respuesta germinativa de semillas bajo diferentes condiciones de priming o acondicionamiento.
- Establecer las condiciones propicias para el establecimiento y sobrevivencia de las plántulas.
- Evaluar la respuesta fotoblástica de la semilla.
- Determinar el tipo de corte al bulbo madre que produzca más bulbillos y/o biomasa.
- Identificar la respuesta de los fragmentos de bulbo a reguladores de crecimiento (AIB).
- Identificar los alcaloides de los diferentes órganos de *H. concolor* (bulbos, túnica, hojas, raíces, escapo floral fresco y seco y semillas).

7 Materiales y métodos

7.1 Propagación sexual

7.1.1 Colecta de semillas

Se colectó el material vegetal de diferentes sitios de la REPSA, seleccionando aquellos individuos que contaban con frutos maduros, iniciando la dehiscencia y tomando únicamente las semillas. La colecta se realizó del 21 al 29 de junio de 2016.

Las semillas fueron seleccionadas con base en sus características físicas externas, eliminando aquellas semillas deformes o vanas. Se contabilizó y agrupó el material vegetal en lotes de 100 semillas cada uno, se mantuvieron en bolsas de papel a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2.7$) para su posterior uso.

7.1.2 Morfofisiología

Dentro de las pruebas morfofisiológicas se evaluó el peso, longitud, contenido de humedad, viabilidad con tetrazolio e imbibición.

7.1.2.1 Peso y longitud

Se registró el peso de 1000 semillas con la balanza analítica (g), así como la medida en el eje transversal y longitudinal (cm) de las semillas utilizando un Vernier.

7.1.2.2 Contenido de humedad

Para conocer el contenido de humedad (con base en peso seco) se usaron diez lotes de diez semillas cada uno, éstas se colocaron en cajas de aluminio y se pesaron en la balanza analítica. Posteriormente se destaparon las cajas y se metieron a la estufa a 104°C , las cuales permanecieron al interior por 17 horas. Transcurrido el tiempo, se sacaron de la estufa y se mantuvieron en el desecador hasta enfriarse

completamente, para medir el peso final de la caja con las semillas secas (Moreno, 1984; Gordon *et al.*, 1991).

De igual manera, se midió el contenido de humedad posterior a imbibición de diez lotes de diez semillas cada uno, para conocer el contenido de humedad absorbido. Después de la hidratación, se eliminó el excedente de agua y cada lote fue colocado en la estufa, a una temperatura de 104°C durante 17 horas. Se registró el peso inicial y final de cada grupo de semillas.

7.1.2.3 Viabilidad con tetrazolio

Para determinar la viabilidad de la semilla, se tomaron cinco lotes de diez semillas cada uno, las cuales se colocaron en frascos y se dejaron en imbibición por 24 horas. Posteriormente, se realizó la disección de las semillas hidratadas para obtener los embriones en un frasco ámbar con solución de cloruro de tetrazolio (2, 3, 5-trifenil tetrazolio) al 1% en buffer de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se observaron los embriones al microscopio estereoscópico y se registró la coloración de los mismos (Fig. 4) (Gordon *et al.*, 1991).



Figura 4. Procedimiento para la prueba de viabilidad con tetrazolio.

7.1.2.4 Imbibición

Se realizó la prueba de imbibición con 100 semillas, separadas en diez lotes de diez semillas cada uno. Cada lote se pesó en la balanza analítica para determinar el peso seco inicial. Después se colocaron los lotes en frascos con agua destilada (22°C) y transcurridos 5 minutos, se eliminó el exceso de agua con ayuda de un colador y se registró nuevamente el peso de las semillas. Posteriormente, se regresaron las semillas al frasco y se agregó nuevamente agua destilada, repitiendo el procedimiento cada 5, 10, 15 y 30 minutos y después cada 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, registrando el peso en cada lapso de tiempo. Finalmente, dichas semillas se emplearon para la prueba de germinación preliminar, para conocer el tiempo transcurrido hasta la emergencia de la radícula.

7.1.3 Germinación y sobrevivencia

Para evaluar el porcentaje de germinación de las semillas, éstas se colocaron en cajas Petri, con discos de papel absorbente (tres en la base), se hidrató el papel con 2.5 mL de antifúngico (Captán®) al 0.2%, se sembraron diez semillas por caja, después se cubrieron con dos discos de papel absorbente y se agregaron 2.5 mL más de Captán®. Se sellaron las cajas con Egapack y se colocaron a temperatura ambiente (26°C ± 2.7), con fotoperiodo 12/12 (luz/obscuridad).

Se llevó a cabo la revisión de las cajas cada tercer día, anotando el número de semillas que germinaron con el transcurso del tiempo. Posteriormente, cuando las plántulas adquirieron un tamaño superior a los 10 cm de largo, fueron trasplantadas a sustrato con tierra negra, agrolita y vermiculita en una proporción 1:1:1. Se mantuvieron las plántulas en el laboratorio a temperatura ambiente (26°C ± 2.7) con fotoperiodo 12/12 durante los primeros dos meses, para posteriormente ser reubicadas al invernadero de la Facultad de Ciencias, con temperatura promedio anual de 21 °C (con máximas y mínimas de 33 y 14 °C, respectivamente), y humedad relativa promedio de 56% (con máximas y mínimas de 76 y 89 %, respectivamente) (Anexo 1). Realizando un riego abundante con solución de

Raizal ® 400 al 0.2% una vez por semana durante un año. Se registró el porcentaje de plantas sobrevivientes conforme el tiempo de permanencia en el invernadero.

7.1.4 Velocidad de germinación

Para determinar el mejor tratamiento que aumentara la velocidad de germinación, se utilizó la siguiente fórmula (Paniagua *et al.*, 2015):

$$VG = (SG(1)/1+(SG(2)-SG(1))/2+\dots+(SGn)-SG(n-1))/n$$

Donde:

SG(n): número de semillas germinadas al conteo n.

7.1.5 Almacenamiento

Se almacenaron 1350 semillas, para lo cual se hicieron nueve lotes de 150 semillas. Éstas permanecieron en la estufa nueve días a 34°C con la finalidad de reducir el porcentaje de humedad a menos del 5% (Hong y Hellis ,1995). Después, cada lote se colocó en frascos de vidrio con tapón (agregando algodón en el frasco para proteger las semillas) y se sellaron con Egapack, los frascos se introdujeron en bolsas negras. Se establecieron tres temperaturas para almacenamiento, con tres lotes de semillas cada uno: 1) 8°C (refrigeración), 2) -20°C y 3) temperatura ambiente (26°C ± 2.7). El almacenamiento se llevó a cabo durante 3, 6 y 9 meses. Transcurrido cada tiempo, se tomó un lote de cada temperatura y de las 150 semillas contenidas en cada uno se evaluó la viabilidad, el contenido de humedad y la germinación con 50 semillas en cada prueba bajo las condiciones señaladas anteriormente.

7.1.6 Priming o acondicionamiento

7.1.6.1 Control e hidropriming

El control (semillas sin tratar) e hidropriming consistió en la imbibición de dos lotes de 100 semillas en agua destilada (22°C) durante 24 horas, posteriormente el agua fue eliminada. En las semillas control se realizó la siembra, mientras que las semillas del hidropriming se colocaron al interior de una estufa de secado por 48 horas a 34°C, transcurrido el tiempo de secado se realizó la siembra bajo las condiciones señaladas anteriormente (modificado de Jiisha, 2013).

7.1.6.2 Termopriming

La prueba de termopriming se llevó a cabo con dos lotes de 100 semillas cada uno. El tratamiento consistió en colocar los diferentes lotes en agua destilada a 2 diferentes temperaturas: 8 y 34°C. Cada lote se colocó en frascos por 24 horas, con el agua con la temperatura específica y posteriormente, se retiró el excedente de agua y se pusieron a secar las semillas en la estufa por 48 horas a 34°C. Transcurrido el tiempo de secado las semillas fueron sembradas bajo las condiciones de germinación señaladas anteriormente (modificado de Jiisha, 2013).

7.1.6.3 Priming hormonal

El priming hormonal se llevó a cabo con cuatro lotes de 100 semillas cada uno. El tratamiento consistió en colocar los diferentes lotes en soluciones hormonales: auxinas (Radix® T3000) y giberelinas (BioGib® 10PS), a 50 y 100 ppm. Las semillas permanecieron en esta solución por 24 horas, posteriormente se retiró el excedente de solución y se pusieron a secar en la estufa por 48 horas a 34°C. Transcurrido el tiempo de secado las semillas fueron sembradas bajo las condiciones de germinación señaladas anteriormente (modificado de Jiisha, 2013).

7.1.6.4 Osmopriming

El tratamiento osmótico se realizó con dos lotes de 100 semillas cada uno las cuales fueron embebidas durante 24 horas en soluciones osmóticas de manitol a -3 y -6 atmósferas (atm). Posteriormente, se

colocaron en la estufa a 34°C para un secado de 48 horas, se sembraron en cajas Petri en las condiciones de germinación señaladas anteriormente (modificado de Jiisha, 2013).

7.1.7 Fotoblastismo

Se utilizaron cuatro lotes de 50 semillas cada uno, se colocaron en imbibición durante 24 horas para posteriormente retirarles la cubierta seminal bajo luz verde de seguridad. Bajo esta condición lumínica, los embriones se sembraron en cajas Petri sobre papel absorbente, adicionando 4 mL de Captan® al 0.2%. Se sellaron con Egapack y fueron colocadas en distintas condiciones de luz: roja (650-630 nm), roja lejana (730 nm) y luz blanca, con fotoperiodo 12/12 y en obscuridad. Las condiciones lumínicas se lograron mediante cajas plexiglás que filtran la luz a la longitud de onda deseada, con los siguientes valores de irradiancia fotónica: luz roja: 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, luz roja lejana 0.09 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y luz blanca 33.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Para la condición de obscuridad las cajas se cubrieron con papel aluminio. Las revisiones fueron realizadas en luz verde de seguridad.

7.2 Propagación asexual

7.2.1 Obtención del material

Se utilizaron 29 bulbos del invernadero del Instituto de Química de la UNAM, los cuales habían sido colectados previamente en 2010 en la REPSA y estaban plantados en macetas usando tierra negra como sustrato. También se rescataron 49 bulbos en el pedregal del estacionamiento de la Facultad de Ciencias de la UNAM en el año de 2017 (Fig. 5). Ambos grupos recibieron el mismo tratamiento que se menciona a continuación.



Figura 5. Bulbos de *H. concolor* colectados en la Facultad de Ciencias de la UNAM colectados en 2017.

7.2.2 Medición y procesamiento de bulbos

Una vez obtenidos los bulbos se les retiró el excedente de tierra y se cortaron hojas y raíces para su uso posterior en fitoquímica. A los bulbos se les midió la altura (del disco basal, hasta donde inicia el cuello del bulbo), el diámetro transversal y el peso de cada uno de ellos (Fig. 6).

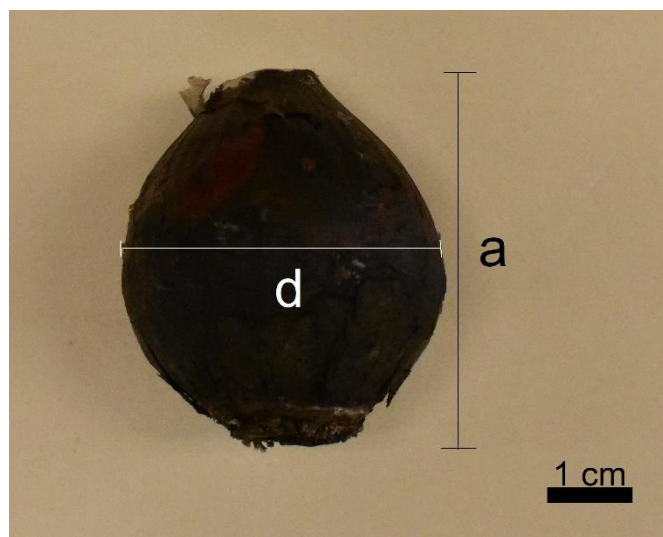


Figura 6. Medición de bulbos de *H. concolor*: a) altura y d) diámetro transversal.

7.2.3 Lavado y desinfección

Posteriormente se llevó a cabo el lavado y desinfección de todos los bulbos mediante el método de Rosselló *et al.*, 2006, modificado por Soriano-García, 2019. Se colocaron los bulbos en una cubeta con agua corriente adicionando dos gotas de jabón comercial para remover la tierra y la túnica (catáfilas externas membranosas y secas) (Fig. 7); se desinfectaron con cloro comercial al 0.03% durante 15 minutos, seguido de un enjuague con agua corriente. Posterior a la desinfección, los bulbos se disectaron.



Figura 7. Lavado y desinfección de bulbos de *H. concolor*.

7.2.4 Tratamientos utilizados

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

-Bulbo completo (control) (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) (Fig. 8 a)

-Medios longitudinales (twin scaling): corte longitudinal obteniendo dos secciones, usando ambas (Schiappacasse *et al.*, 2002) (Fig. 8 b).

-Sección basal: corte transversal al eje del bulbo, plantando la parte basal (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) (Fig. 8 c).

-Corte longitudinal en cuartos: (twin scaling) corte vertical en 4 secciones (Schiappacasse *et al.*, 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) (Fig. 8 d).

-Escamas internas y externas: corte transversal y longitudinal del bulbo, usando los segmentos basales, de los cuales se separaron en dos grupos las escamas internas y externas. Los cortes se realizaron procurando mantener parte del platillo o disco basal en los dos segmentos obtenidos. (Padilla-Sánchez, 2016) (Fig. 8 e).

-Corte por mitad de sección basal: corte longitudinal y transversal al eje del bulbo, obteniendo 4 segmentos, utilizando únicamente las dos partes con disco basal (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) (Fig. 8 f).

-Corte de la sección basal en cuartos: se realizó el corte de la sección basal del bulbo en cuartos (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) (Fig. 8 g).

Los segmentos de los bulbos obtenidos fueron colocados en una solución antifúngica de Captan® al 0.2% durante 15 minutos, posteriormente se realizaron dos tratamientos: 1) siembra directa del material vegetal y 2) imbibición en solución hormonal con ácido indol-3-bitírico (AIB) a 1500 ppm (Radix® T 3000, diluido con agua destilada, proporción 1:1) durante 8 horas, para su posterior siembra.

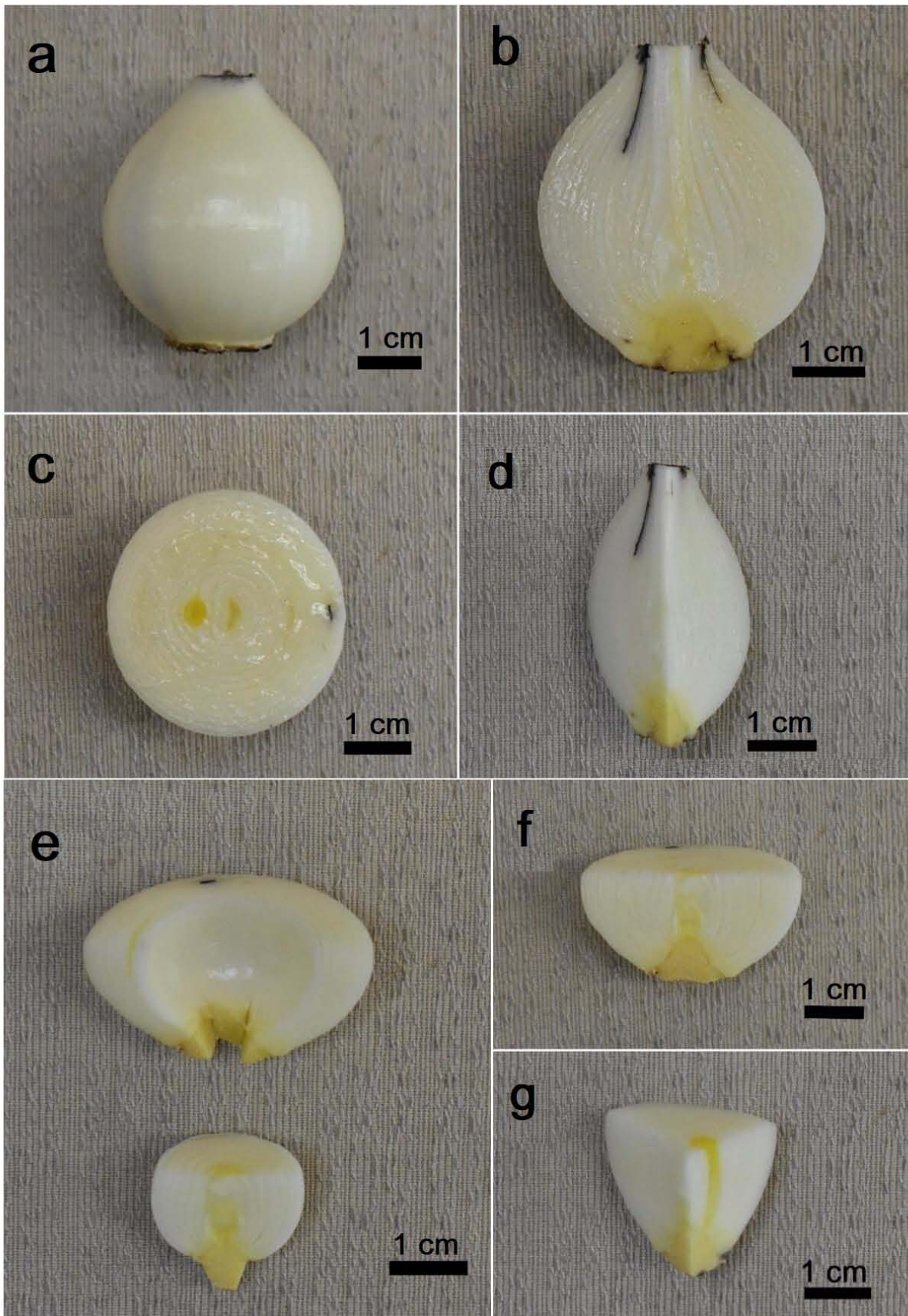


Figura 8. Tipos de corte en los bulbos de *H. concolor* a) bulbo completo (control), b) medios longitudinales, c) corte por mitad de sección basal, d) corte longitudinal en cuartos, e) escamas internas y externas, f) corte por mitad de la sección basal y g) corte de la sección basal en cuartos. (Foto: Soriano-García, 2019).

7.2.5 Siembra del material

Los fragmentos de los bulbos se sembraron en macetas negras de 7” procurando que el bulbo o segmento del bulbo quedara con igual proporción de sustrato tanto en la parte inferior como en la superior. El sustrato utilizado fue agrolita y vermiculita en una proporción 1:1. El primer riego fue con solución de Captan® al 0.2%, posteriormente, se regó una vez por semana únicamente con agua. Las macetas se colocaron en el invernadero del Instituto de Química, con temperatura promedio anual de 21 °C (con máximas y mínimas de 33 y 14 °C, respectivamente) y humedad relativa promedio de 56% (con máximas y mínimas de 76 y 89 %, respectivamente) (Anexo 2). El desarrollo experimental fue evaluado durante seis meses de julio de 2017 a enero de 2018.

7.2.6 Variables de respuesta

La respuesta de los cortes aplicados al bulbo inicial, fueron evaluadas mediante las siguientes variables:

-Bulbos: número de nuevos bulbos formados, diámetro y altura.

-Hojas: número, ancho y longitud.

Raíces: número de raíces y longitud promedio de las mismas.

Biomasa: peso inicial y final del explante.

Floración y fructificación: se identificaron los bulbos que posteriormente a la propagación asexual desarrollaron dichas estructuras.

7.3 Fitoquímica

7.3.1 Preparación de extractos metanólicos

Del material vegetal de *H. concolor* procedente del invernadero del Instituto de Química y los fragmentos apicales sobrantes de la propagación asexual, se hicieron extractos metanólicos separando raíces, bulbos (catáfilas internas carnosas), túnica (catáfilas externas membranosas y secas), hojas, escapo floral fresco y seco y semillas. Todos los fragmentos vegetales se trituraron y pusieron a secar a la sombra a temperatura ambiente durante tres semanas, excepto el escapo floral fresco. El material se maceró en metanol (MeOH) durante una semana a temperatura ambiente, posteriormente se filtró y se agregó nuevo metanol destilado. Este proceso se realizó de 4 a 6 veces, o hasta observar el disolvente sin ninguna coloración. Todas las extracciones fueron reunidas y el disolvente eliminado mediante presión reducida en un rotavapor. Cada uno de los extractos fueron vertidos en frascos y éstos se colocaron en una cámara de vacío para su completo secado.

7.3.2 Extracción de alcaloides

A los extractos de metanol se les agregó ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 25% y éstos fueron colocados en baño de ultrasonido durante 10 minutos. Después cada uno de los extractos fue procesado de manera individual de la siguiente manera: el extracto se vertió en un embudo de separación, se le adicionó diclorometano (CH_2Cl_2) y se agitó el embudo suavemente hasta la obtención de dos fases. La fase orgánica inferior (FO1) se separó de la fase acuosa superior. La extracción a la fase acuosa se repitió con dos porciones más de diclorometano. Los tres extractos de diclorometano fueron reunidos. Posteriormente, la fase acuosa fue colocada en un embudo de separación y se le agregó hidróxido de amonio (NH_4OH) hasta obtener un pH entre 9-10, en seguida se le adicionó acetato de etilo ($AcOEt$) y se agitó el embudo suavemente para la formación de dos fases, se drenó la fase acuosa inferior de la fase orgánica superior (FO2) rica en alcaloides. La extracción con acetato de etilo se repitió de manera exhaustiva. Por último, el residuo de la fase acuosa se pasó a un embudo de separación, se le añadió una mezcla de $AcOEt/MeOH$ (3:1) y se agitó el embudo suavemente para obtener nuevamente dos

fases. La fase orgánica superior (FO3) se separó de la fase acuosa para obtener los alcaloides más polares (Nóxidos).

7.3.3 Análisis mediante cromatografía de capa fina (CCF)

Los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatofolios de sílica del 60F254 de 5 x 5 cm de tamaño y de 0.25 mm de espesor. Se aplicaron los extractos (5 µL) con un capilar graduado.

La fase móvil utilizada fue AcOEt:MeOH (3:1). Las placas fueron reveladas mediante luz UV, onda corta y larga (254 y 365 nm, respectivamente), así como reactivo Dragendorff para la identificación de alcaloides. Dicho reactivo fue preparado mezclando la solución A y B (proporción 1:1). Solución A: 0.85 g de nitrato básico de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial y 40.0 mL de agua destilada. Solución B: 10.0 g de yoduro de potasio y 40 mL de agua destilada (Wagner y Bladt, 1996).

7.3.4 Análisis del perfil alcaloideo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis de CG-MS de las fracciones alcaloideas (FO2) se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM Agilent 6890 + MSD 5975) con inyección directa de la muestra, operando en modalidad de energía de ionización a 70 eV por impacto electrónico. Se usó una columna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm y 0.25 µm). La temperatura programada fue de 100-180 °C cada 15 min 3^{-1} , y por 1 min se mantuvo a 300°C. La temperatura de inyección fue a los 280°C. La velocidad de flujo del gas acarreador (Helio) fue de 0.8 mL/min. La relación del Split fue de 1:20. Se usó una mezcla de hidrocarburos (C9- C36, Restek, cat No. 31614 para realizar la calibración del índice de retención).

Los cromatogramas y espectros de masas fueron identificados por comparación, con base en su espectro de masas, mediante el software AMDIS 2.64 Search Library NIST y a partir de búsqueda bibliográfica por distintos autores. Aquellos compuestos que no lograron ser identificados se describieron por la relación masa/carga (m/z) de su pico base/ión molecular (M^+). En la fracción de

alcaloides, se expresa la proporción de cada compuesto como un porcentaje del total de alcaloides, sin embargo, este valor no expresa la cantidad real, únicamente se utiliza para comparar la cantidad relativa de cada compuesto.

7.4 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos en porcentaje se aplicó la raíz cuadrada del porcentaje y se calculó el arcoseno de este valor (valor transformado). Se evaluó si cumplían con los dos criterios siguientes: 1) homocedasticidad (Levin, Cochran y Bartley) y 2) distribución normal (Shapiro-Wilk). En caso de cumplir ambos supuestos, los datos se analizaron mediante ANDEVAs (estadístico de prueba "F") y pruebas de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$) (Statgraphics Centurion XVII). En caso de que aún con los valores transformados no se cumplieron estos dos criterios, se analizaron mediante estadística no paramétrica (Kruskal Wallis) (KW) utilizando los valores en porcentaje (obteniendo el estadístico de prueba "H") y la prueba de rango múltiple de Kruskal-Wallis para identificar aquellos tratamientos que causaron las diferencias significativas ($P < 0.05$) (Stat Soft. Inc. 2007. STATISTICA 8.0).

8 Resultados y discusión

8.1 Propagación sexual

8.1.1 Colecta de semillas y procesamiento

Del material colectado se utilizaron 3000 semillas en buen estado (aplanadas y en forma de media luna) (Fig. 9 a) y el resto de las semillas se descartaron si presentaron mala calidad (con malformaciones (arriñonadas), vanas o visiblemente dañadas) (Fig. 9 b).

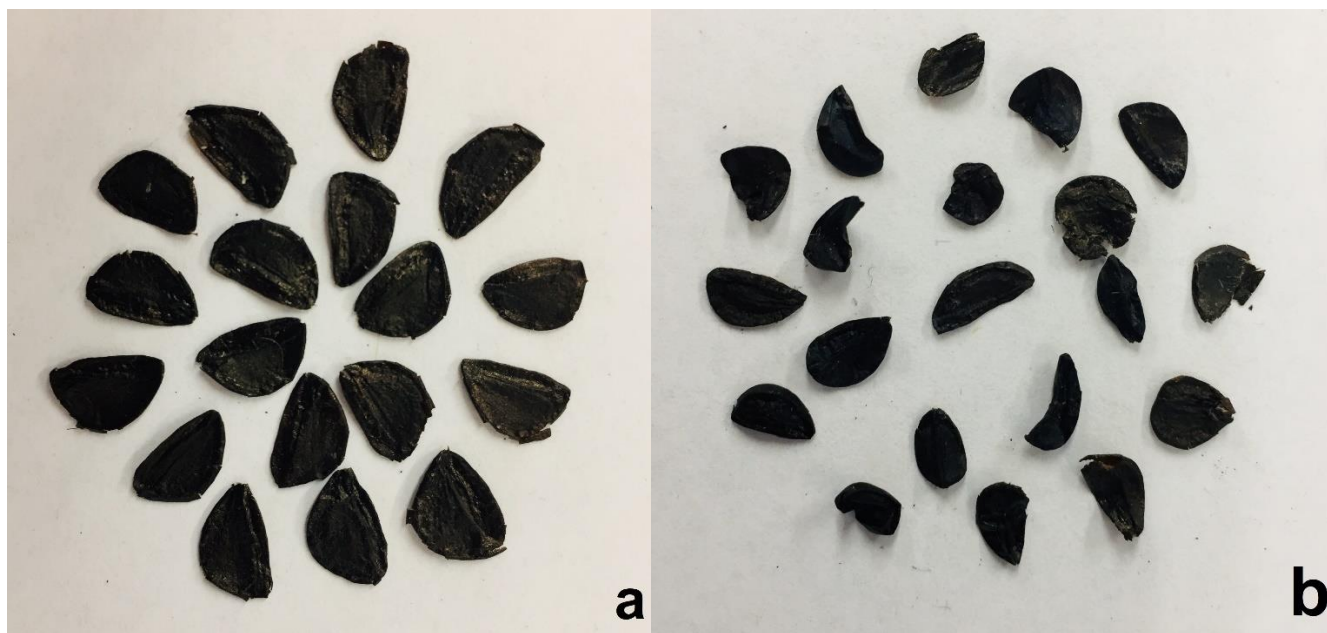


Figura 9. Semillas de *H. concolor*. **a)** semillas en buen estado. **b)** semillas descartadas.

8.1.2 Morfofisiología

8.1.2.1 Peso y longitud

El peso de mil semillas fue de $4.133 \text{ g} \pm 9.3 \times 10^{-4} \text{ e.e.}$ (error estándar) El tamaño promedio registrado de 100 semillas fue de $9.75 \text{ mm} \pm 0.87 \text{ e.e.}$ en su eje longitudinal y de $6.29 \text{ mm} \pm 0.49 \text{ e.e.}$ en su eje ecuatorial (Fig. 10).

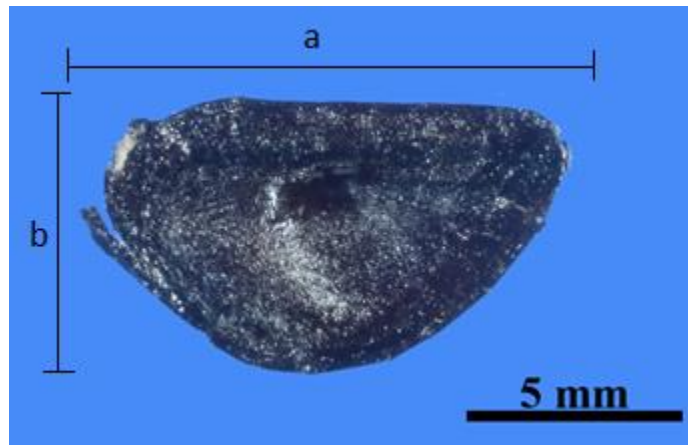


Figura 10. Semilla de *H. concolor*: **a)** eje longitudinal y **b)** eje ecuatorial. (Foto: Bieler, A.)

8.1.2.2 Contenido de humedad (peso seco)

El contenido de humedad del lote analizado en las semillas de *H. concolor*, posterior a la colecta fue de $7.37 \% \pm 0.77 \text{ e.e.}$

8.1.2.3 Viabilidad con tetrazolio

Los embriones aislados de las semillas recién colectadas mostraron una viabilidad del 70 % (Fig. 11).



Figura 11. Viabilidad de embriones de *H. concolor* con tetrazolio. V= viable. NV= no viable.

La prueba de viabilidad con tetrazolio permite evaluar la viabilidad de un determinado lote mediante una muestra representativa. El lote de semillas analizadas mostró 70% de viabilidad. Determinar que un embrión es viable, se fundamenta en la reacción bioquímica de las células vivas con la sal de tetrazolio, la cual consiste en la reducción del tetrazolio hasta formar un compuesto rojo llamado formazán, una coloración rojo intenso indica la presencia de células vivas en el embrión (Moreno, 1984). Únicamente 30% de los embriones de *H. concolor* resultaron no viables (Fig. 11), debido a que presentaron una coloración parcial, o en algunos casos, nula coloración, indicando la presencia de áreas de tejido muerto, por lo que la existencia de estas áreas necróticas impide el desarrollo de las células embrionarias (Pérez y Pita, 2001). Dicha reacción ocurre dentro de las células y dado que el pigmento rojo que se forma es insoluble, no hay difusión del color rojo a las otras células (Moreno, 1984).

8.1.2.4 Imbibición

En el tiempo cero el peso inicial de las semillas fue $0.04 \text{ g} \pm 0.0006 \text{ e.e.}$ y el contenido de humedad de $7.37 \% \pm 0.77 \text{ e.e.}$ (Fig. 12). Se encontraron diferencias significativas en el aumento del peso de las semillas ($F=193.7$, $P=0$) ya que con el paso de tiempo, la semilla fue absorbiendo mayor cantidad de agua y tras 24 horas de imbibición alcanzó $0.28 \text{ g} \pm 0.01 \text{ e.e.}$, con un contenido de humedad de $81.74\% \pm 1.59 \text{ e.e.}$ El peso continuó aumentando hasta las 72 horas, con un peso superior a 0.3 g.

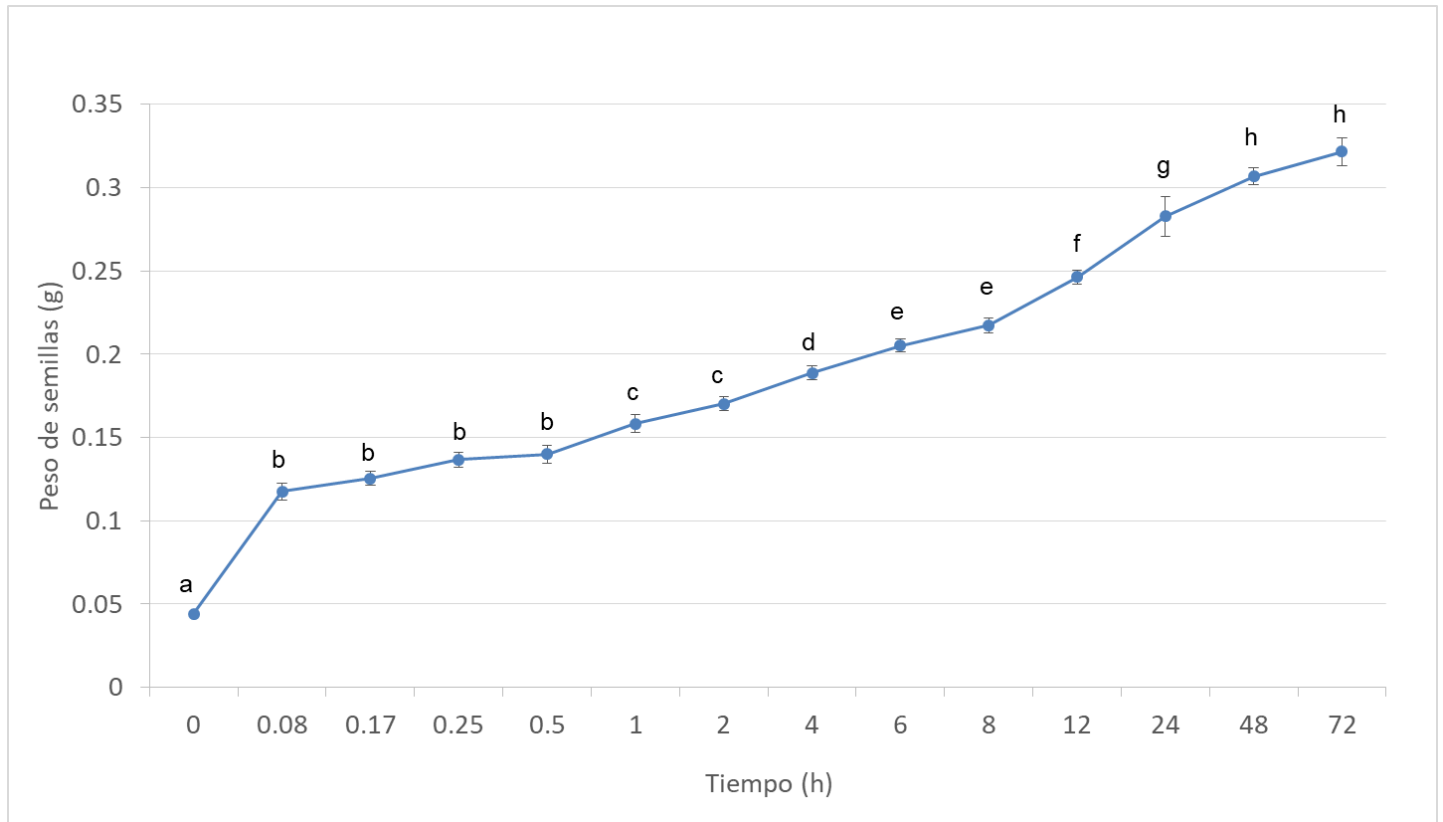


Figura 12. Peso de las semillas durante un periodo de imbibición de 72h. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\pm \text{e.e.}$) ($P < 0.05$).

El desarrollo exitoso de una semilla depende de múltiples factores, tanto internos como externos. Dentro de los factores internos está la viabilidad del embrión, cantidad y calidad de tejidos de reserva, presencia de tegumentos duros, longevidad, latencia, entre otros. Mientras que los principales factores externos son la disponibilidad de agua, temperatura y tipos de luz (Russo *et al.*, 2010, Citado por: Suárez y Melgarejo, 2010; Pérez, 2017), los cuales delimitarán el correcto desarrollo de un nuevo individuo. Para realizar un protocolo de propagación, es necesario hacer pruebas preliminares al lote de semillas colectadas, a partir de las cuales, conoceremos las características físicas y fisiológicas del material vegetal a propagar, los cuales permitan predecir sus posibilidades de éxito (Peretti, 1994). El peso de 1000 semillas, es un dato agronómico que nos permite rápidamente tener una idea de la cantidad de las semillas contenidas en una muestra y en caso de requerir sembrar en áreas de gran extensión, inferir fácilmente la cantidad de semillas necesarias a plantar.

El tamaño y forma de las semillas, ayuda a identificar aquellas que se encuentran en mal estado. Las semillas catalogadas como “sanas” tuvieron en promedio 9.75 mm en el eje longitudinal y 6.29 mm en su eje transversal, con forma de medio círculo (Fig. 10). En la colecta realizada, aquellas semillas deformes (arriñonadas) o muy alargadas (Fig. 9 b), se desecharon, ya que la estructura de las semillas, está relacionada directamente con su función (Peretti, 1994) y al realizar la propagación por semilla, se buscan las mejores características físicas.

La humedad en las semillas es el factor más importante en la vida de las mismas, de acuerdo a su reacción a los niveles de humedad, se pueden clasificar en ortodoxas, aquellas que sobreviven a bajos niveles de humedad, siendo capaces de tolerar la desecación y recalcitrantes en donde las semillas sobreviven sólo en altos porcentajes de humedad (Roberts, 1972; Berjak y Pammenter, 2010).

Las semillas de *H. concolor* recién colectadas tuvieron 7.37% de humedad, lo cual nos habla de una semilla ortodoxa (se discutirá más ampliamente esta observación en el contenido de humedad de las semillas almacenadas).

Otro factor que interfiere en el desarrollo de la semilla, es el ingreso de agua o tasa de imbibición, la cual está afectada por diferentes factores como: permeabilidad de la cubierta, concentración de sales, temperatura, presión hidrostática, etc., los cuales pueden intervenir en la respuesta germinativa (Pérez, 2017). Se evaluó la imbibición en agua en las semillas de *H. concolor*, para determinar la permeabilidad de la cubierta; al tiempo cero las semillas secas pesaron 0.04 g, con el paso del tiempo se observó un continuo aumento de peso y tras 24 horas de imbibición las semillas incrementaron en un 700% su peso, es decir llegaron a 0.28 g, lo cual nos indica la entrada de agua, comenzando así la primer etapa en el proceso germinativo, la imbibición (Suárez y Melgarejo, 2010). La cantidad de agua absorbida por la semilla está fuertemente influenciada por el tipo de sustancias de reserva, ya que las que contienen endosperma protéico, son altamente hidratables, en comparación con aquellas con endosperma amiláceo (Pérez, 2017); se infiere que la composición proteica en las semillas de *H. concolor* favoreció la entrada de agua. Debido a que la semilla resultó permeable, no fue necesario aplicar ningún proceso de escarificación previo a la siembra.

8.1.3 Germinación de semillas recién colectadas y sobrevivencia

Las semillas recién colectadas durante los primeros 10 días alcanzaron 32% de germinación, a partir del día 12 se alcanzó más del 85%, para concluir la emergencia radicular al día 14, con 96% (Fig. 13).

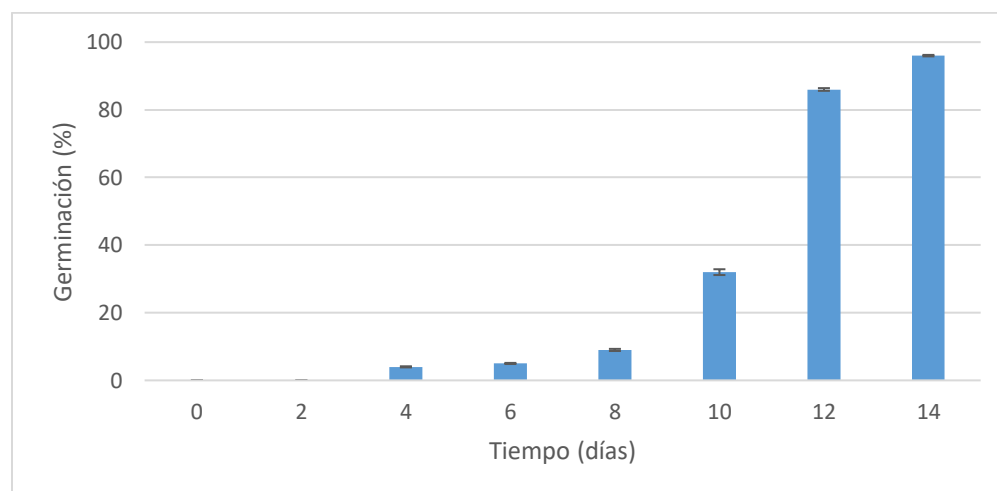


Figura 13. Porcentaje de germinación de semillas recién colectadas (\pm e.e).

De un total de 100 semillas, germinaron 96 (Fig. 14 a). Las plántulas fueron trasplantadas a semilleros. Durante distintos lapsos de tiempo se registró el conteo de las plantas sobrevivientes. Se registró para el segundo mes 64% de las plántulas vivas (Fig. 14 b), que presentaban hojas muy delgadas con coloración verde brillante (Fig. 15 a). Posteriormente, a los siete meses del trasplante, únicamente 45% de los individuos permanecían vivos, este último porcentaje se mantuvo al año de siembra y presentaban hojas más gruesas de color verde opaco (Fig. 14 c y Fig.15 b).

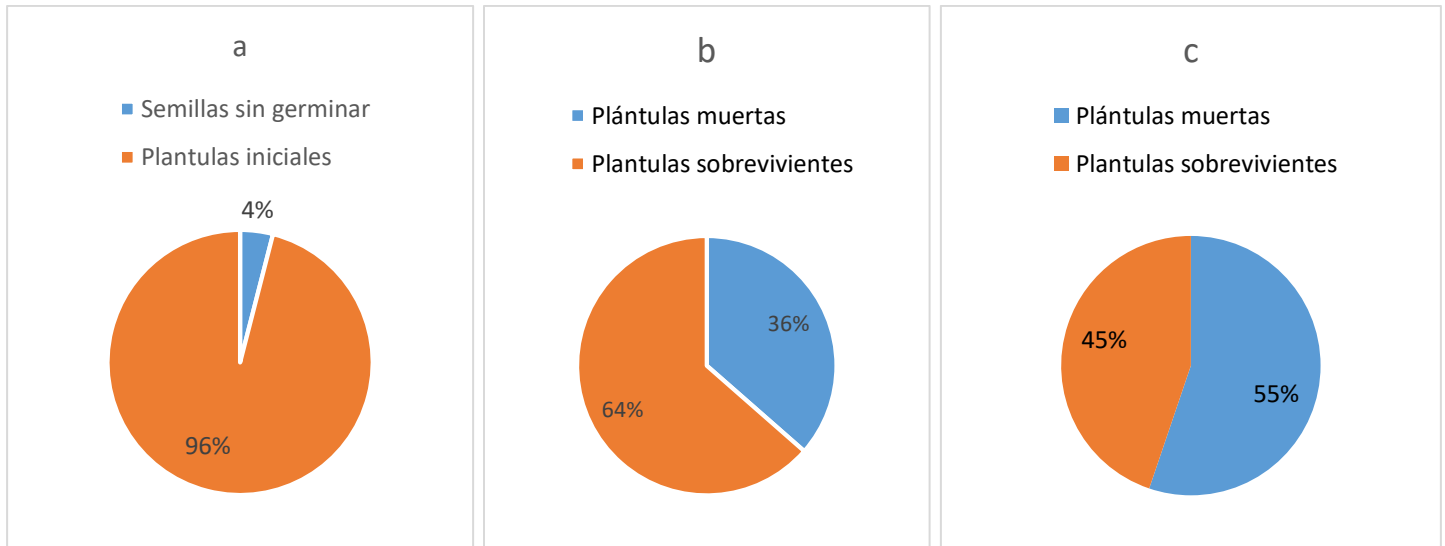


Figura 14. Porcentaje de plantas muertas y sobrevivientes después de: **a)** siembra, **b)** 2 meses y **c)** 7 meses y 1 año en el invernadero.

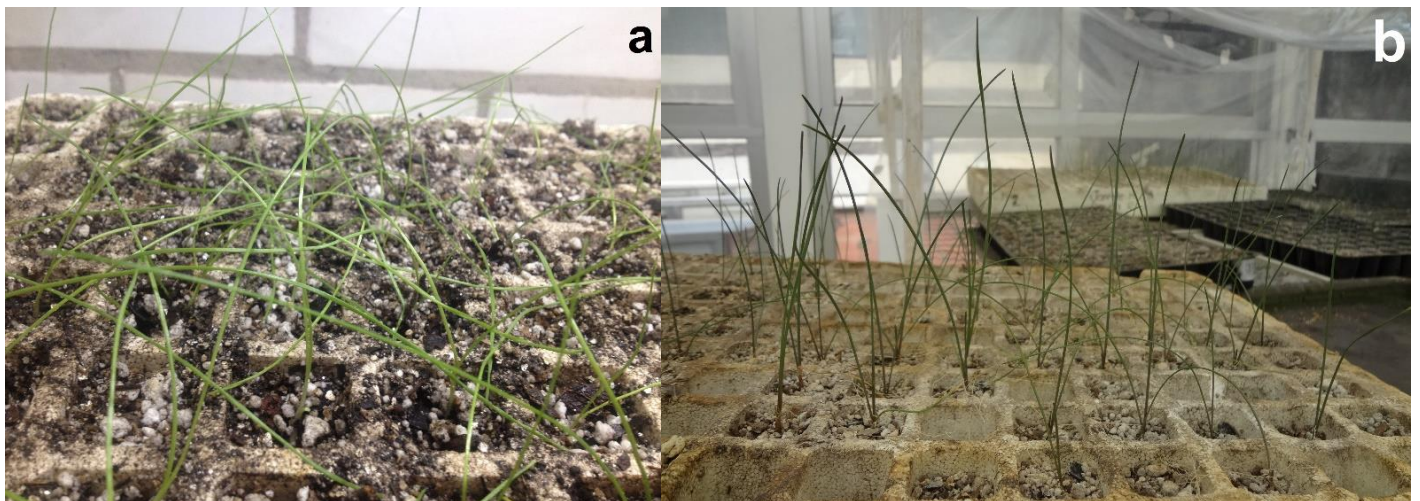


Figura 15. Plántulas sobrevivientes: **a)** después de 2 meses del trasplante y **b)** Plántulas sobrevivientes después de 7 meses del trasplante.

Se observó un alto porcentaje de germinación en las semillas, con el 96% (Fig. 14 a). La germinación de semillas y el subsecuente desarrollo de las plántulas se verá influenciada por múltiples factores, tanto por las características genótípicas de las plantas (viabilidad, vigor, tegumentos), como por las condiciones ambientales en las que se desarrolle (temperatura, humedad, sustrato, luz, etc.) (Alpi y Tognoni, 1991). Durante el proceso de germinación, las semillas llevan a cabo la reactivación y movimiento de reservas, dichas reservas se encargan de alimentar a la plántula antes de que se convierta en un organismo autótrofo (Matilla, 2008). Se mantuvieron las plántulas dentro de la caja Petri, hasta alcanzar el mayor tamaño posible (de 10 a 15 cm aprox.) mientras hacían uso de las reservas alimenticias contenidas en el endospermo.

Las plántulas, al ser trasplantadas a sustrato y permanecer en el laboratorio por los primeros dos meses (temperatura ambiente a $26^{\circ}\text{C} \pm 2.7$), mostraron una disminución en la sobrevivencia a 64% (Fig. 14 b y 15). La muerte del resto de las plántulas pudo estar causado principalmente por dos factores: 1) características internas de las plántulas (poco vigor en las semillas, plántulas pequeñas y con malformaciones) y 2) causado por las condiciones ambientales, ocasionada por salir de la caja Petri. Al interior de la caja las condiciones microambientales son estables, al no haber fluctuaciones drásticas en la temperatura, luz y la disponibilidad de agua en todo momento. El trasplante a sustrato requiere la aclimatación de las plantas a las nuevas condiciones ambientales, donde los estomas juegan un papel muy importante al encargarse de controlar la pérdida de agua a través de la transpiración (Fontaíña *et al.*, 1993; Lawson y Blatt, 2014; Álvarez-Holguín *et al.*, 2018), evitando así la evapotranspiración y el estrés hídrico al que se enfrenta la planta al cambiar de ambientes durante el trasplante.

Posteriormente, los individuos de *H. concolor*, fueron reubicados al invernadero de la Facultad de Ciencias para continuar su desarrollo, por lo que las condiciones ambientales, nuevamente se vieron modificadas, encontrando que después de permanecer por cinco meses en semilleros (diciembre-abril) en el invernadero, la mortalidad de individuos se elevó al 55 % (Fig. 14 c). Dicha mortalidad pudo haber

sido causada por las condiciones ambientales del invernadero ya que a pesar de no ser la temperatura más alta en ese periodo del año, conforme concluía el invierno y comenzaba la primavera, la temperatura al interior iba en aumento, presentando máximas diurnas por arriba de los 35°C y humedad escasa del 18% (Anexo 1), lo cual pudo causar la muerte por deshidratación en los individuos de *H. concolor*.

Posterior a siete meses en semilleros, los individuos de *H. concolor* fueron trasplantados a macetas de 3", conservando el sustrato anteriormente mencionado. Fue ahí donde se observó que los bulbos eran inferiores a 1 cm de diámetro (Soriano-García 2019, *obs. pers.*), notando así el lento crecimiento de esta especie. Las plantas al cumplir un año de vida, registraron el mismo porcentaje de sobrevivencia comparado con el observado a siete meses, manteniéndose en 45% (Fig. 14 c y 15). En este lapso de tiempo, las condiciones ambientales al interior del invernadero con: 1) altas temperaturas y bajo porcentaje de humedad durante finales de la primavera y 2) el subsecuente aumento en el porcentaje de humedad y ligera disminución de la temperatura (Anexo 1), ocasionado por la época de lluvias típica de verano; no mostró tener consecuencias negativas en la sobrevivencia de *H. concolor*, ya que para ese momento, los individuos ya habían formado un bulbo, el cual al ser una estructura de resistencia y almacenaje de recursos le permitió a la especie sobrevivir fácilmente a las condiciones del invernadero (Abbott y Evans, 2006; González *et al.*, 2007).

Con base en el porcentaje de sobrevivencia presentado a los dos, siete meses y un año (Fig. 14 b y c,) se observó que el estrés hídrico en los individuos de *H. concolor*, también está siendo influenciado por la fenología de la especie, ya que a los dos meses, donde el bulbo estaba comenzando a desarrollarse, hubo un aumento en el porcentaje de plantas muertas, en comparación con los individuos a los siete meses y un año, donde el porcentaje de plantas muertas no incrementó, coincidiendo que en ambas etapas, el bulbo ya se encontraba desarrollado. Se ha visto algo similar en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que tienen extrema sensibilidad al estrés hídrico y al calor en determinadas etapas fenológicas: crecimiento, floración, formación de vainas; disminuyendo el

rendimiento y calidad de producción en granos y número de vainas, causado por insuficiencia en la humedad del suelo (Miranda y Belmar, 1977; Rayney y Griffiths, 2005).

Otro factor a considerar en el desarrollo de las plantas fue el sustrato empleado, ya que éste debe permitir el anclaje de las plantas mediante el desarrollo radicular, por lo que se considera fue el adecuado para el crecimiento de *H. concolor*. La mezcla de sustrato utilizado contenía agrolita y vermiculita sustratos químicamente inertes, que no intervienen en el desarrollo de la planta; en combinación con tierra negra, un sustrato que no sólo funciona como soporte, sino también se ve involucrado en la adsorción y fijación de nutrientes (Sáez y Narciso, 1999). La vermiculita tiene alta capacidad para retener la humedad, sin embargo, puede llegar a comprimirse con el tiempo (Bunt, 1988), por lo que la mezcla con agrolita, al ser porosa evita que se comprima, contribuyendo con el drenaje y aireación favoreciendo el intercambio gaseoso dentro del cultivo (Nelson, 1978; Calderón 2005).

8.1.4 Almacenamiento

8.1.4.1 Contenido de humedad

Debido a que el porcentaje de humedad en las semillas recién colectas fue mayor al 5%, se llevó a cabo el secado de los lotes de semillas en la estufa durante 10 días a 34 °C, obteniendo finalmente un contenido de humedad en $2.91\% \pm 1.48$, porcentaje en el cual se pudo realizar el montaje del almacenamiento. Se encontraron diferencias significativas entre la temperatura ($F=16.07$, $P=0$) y tiempo de almacenamiento ($F=10.24$, $P=0$) con respecto al contenido de humedad. En general, las semillas almacenadas en los diferentes meses incrementaron su contenido de humedad, sin embargo no rebasaron el 7% (Fig. 16).

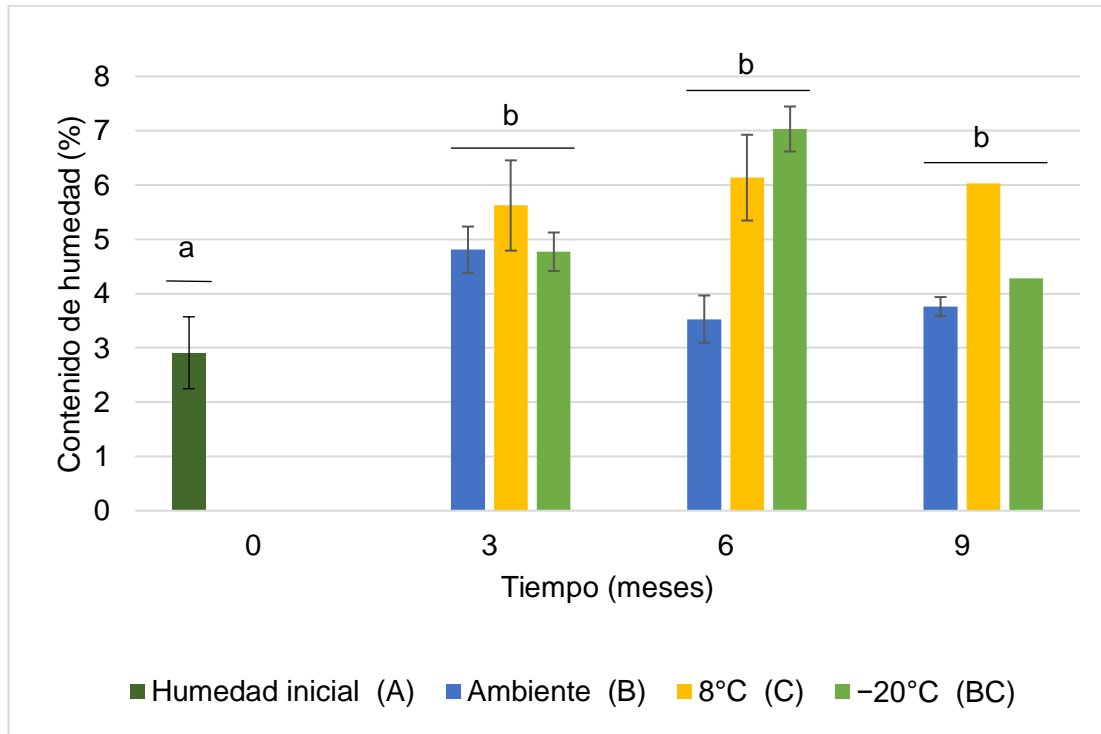


Figura 16. Porcentaje del contenido de humedad de semillas almacenadas durante 9 meses en tres condiciones de temperatura (\pm e.e). Las letras diferentes denotan diferencias significativas con $P<0.05$.

8.1.4.2 Viabilidad con tetrazolio

Las tres temperaturas y el tiempo de almacenamiento conservaron la viabilidad de los embriones para germinar. No se encontraron diferencias significativas en la temperatura ($F=2.57$, $P=0.06$) ni el tiempo de almacenamiento ($F=3.2$, $P= 0.03$), respecto al porcentaje de viabilidad de las semillas, con lo que se mantuvo un alto porcentaje de viabilidad en los embriones de *H. concolor* (Fig. 17).

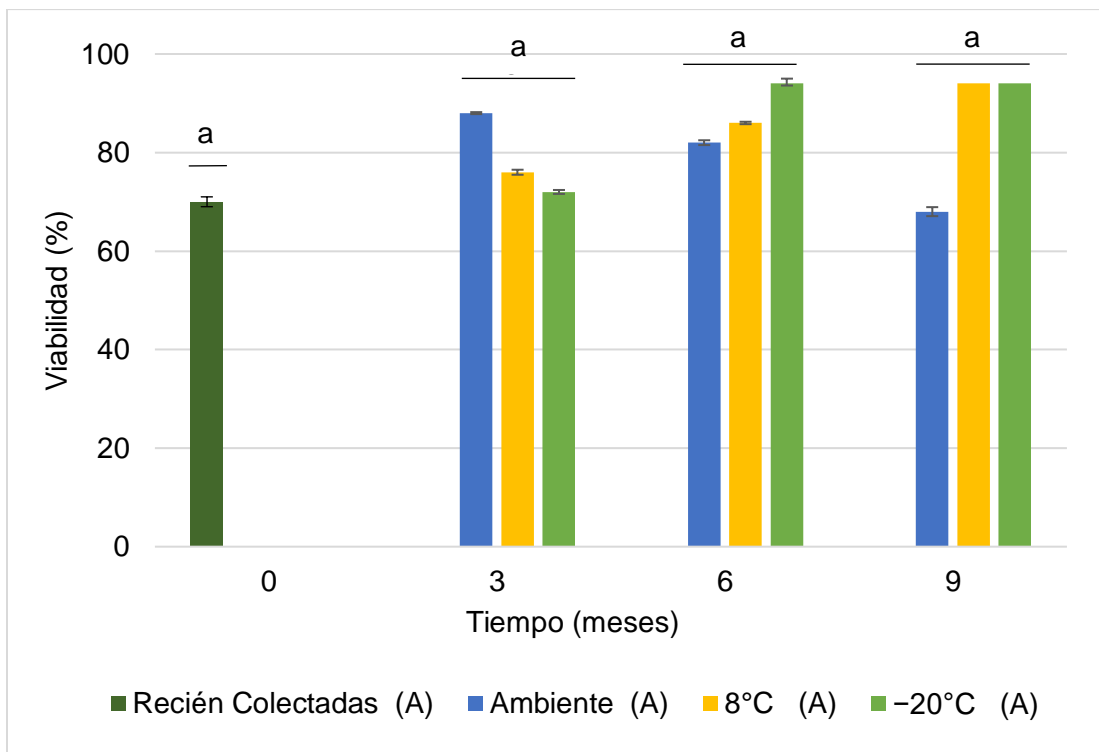


Figura 17. Porcentaje de viabilidad de semillas almacenadas durante 9 meses en tres condiciones de temperatura (\pm e.e). Las letras diferentes denotan diferencias significativas con $P<0.05$.

8.1.4.3 Germinación

Con base en la prueba de KW se encontraron diferencias significativas en los meses de almacenamiento ($H=122.78$, $P=0$) y la temperatura de almacenamiento ($H=23.95$, $P=0$), respecto al porcentaje de germinación (Fig. 18). El almacenamiento de 6 meses a 8°C causó las diferencias al disminuir el porcentaje de germinación a 70% mientras que en el resto de las condiciones la germinación se mantuvo por encima del 80% lo que coincide con el porcentaje promedio de viabilidad (Fig. 17).

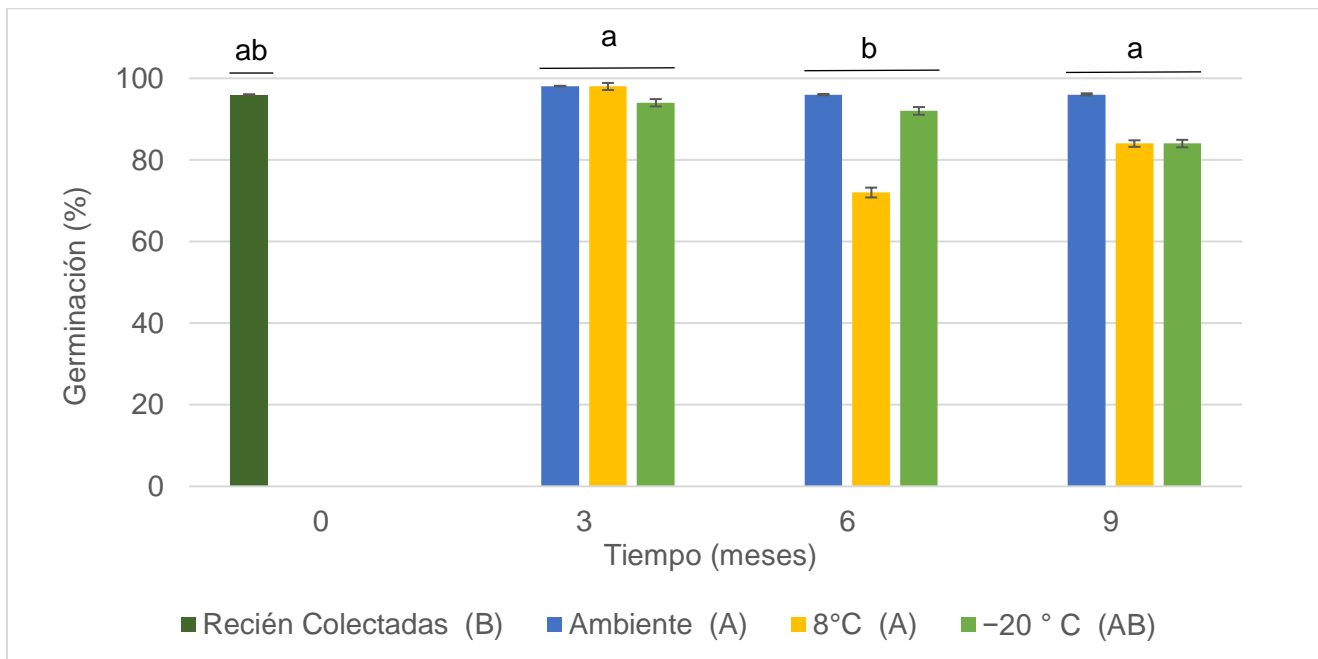


Figura 18. Porcentaje de germinación de semillas almacenadas durante 9 meses en tres condiciones de temperatura (\pm e.e). Las letras diferentes denotan diferencias significativas con $P < 0.05$.

8.1.4.4 Velocidad de germinación

La velocidad de germinación y temperatura de almacenamiento presentaron diferencias significativas ($F=72.52$, $P=0$; $F=4.57$, $P= 0.0062$, respectivamente), respecto al tiempo de almacenamiento (Fig. 19).

Se observó un incremento en la velocidad de germinación con el almacenamiento a 3 meses en todas las temperaturas, misma que disminuyó a los 6 y 9 meses (Fig. 19), sin embargo, no se afectó la capacidad germinativa (Fig. 18).

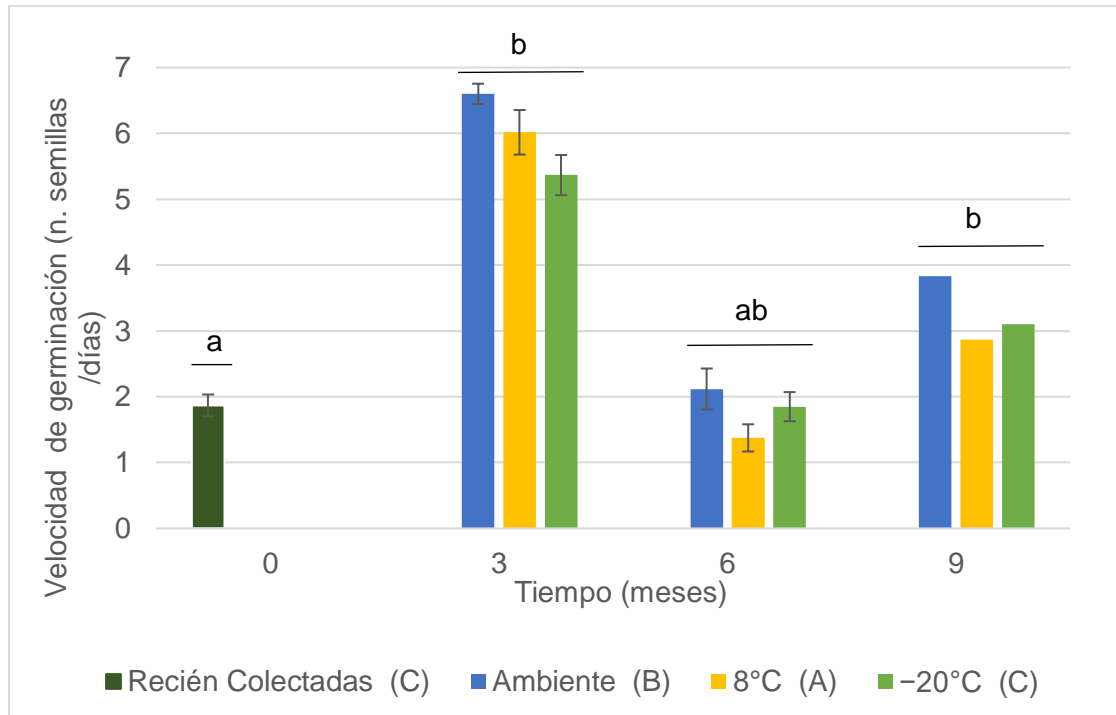


Figura 19. Velocidad de germinación (número de semillas/días) en semillas almacenadas por 9 meses bajo tres temperaturas diferentes (\pm e.e). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$).

El correcto almacenamiento de las semillas debe garantizar la preservación de la calidad hasta ser utilizadas. Las semillas deben conservar la viabilidad, germinación y vigor para asegurar el desarrollo de una nueva planta (Martínez *et al.*, 2009; Hernández y Carballo, 2010).

El contenido de humedad en la preservación de la viabilidad de las semillas radica en la importancia que tiene el agua en los procesos fisiológicos que afectan el vigor y la longevidad de las mismas, así como en el desarrollo de insectos y hongos durante el almacenamiento (Roberts, 1972; Sauer, 1992; Moreno *et al.*, 2000). Se pudo observar que el contenido de humedad durante el tiempo de almacenamiento de las semillas (3, 6 y 9 meses) incrementó significativamente ($P=0$) respecto al valor inicial (por debajo del 3%). Respecto a la temperatura de almacenamiento empleada, la temperatura ambiente resultó ser la mejor, por mantener el más bajo contenido de humedad, inferior al 4.5%, en contraste con 8°C y -20°C, temperatura a la cual se duplicó el porcentaje de humedad inicial, incluso hasta alcanzar el 7% (Fig. 16).

A pesar de identificar el almacenamiento a temperatura ambiente como el que mantiene el contenido de humedad más baja, ser el más accesible y económico en un clima templado como el de la Ciudad de México, se detectaron fluctuaciones en el porcentaje durante los nueve meses (incluso a 8 y -20°C), lo cual indica un intercambio gaseoso de la semilla al interior del frasco con el ambiente, por lo que se sugiere un almacenamiento hermético, el cual evita la entrada oxígeno y humedad a las semillas, por lo que la respiración de la semilla agota el oxígeno existente y reduce la actividad respiratoria, ayudando a que el almacenamiento pueda durar por mayor tiempo (Hernández y Carballo, 2010).

Es importante recalcar, que previo al montaje del almacenamiento fue necesaria la disminución del contenido de humedad del 7.37% (de las semillas recién colectadas) a 2.91%, favoreciendo la sobrevivencia al almacenamiento por largos periodos de tiempo (Roberts, 1972, Gold *et al.*, 2004), lo cual se pudo corroborar con la prueba de viabilidad ya que bajo las temperaturas empleadas se

mantuvo un alto porcentaje de viabilidad hasta los 9 meses (superior al 70%) sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 17).

En cuanto a la germinación de las semillas, se observó que el almacenamiento a diferentes temperaturas superó el 85 % de germinación (excepto almacenamiento de 6 meses a 8°C con 72%). A temperatura ambiente fue donde se obtuvo mayor porcentaje de germinación, superando el 96% en semillas almacenadas por 3, 6 y 9 meses, seguida por el almacenamiento a 8°C (Fig. 18). Esto se corrobora con el observado en la velocidad de germinación, donde las semillas almacenadas a 8°C y temperatura ambiente germinaron a mayor velocidad, en comparación con -20°C y las semillas recién colectadas (Fig. 19).

Si bien se mantuvo un alto porcentaje de germinación a través del tiempo (Fig. 18), indicando que las semillas mantienen alto poder germinativo, la velocidad de germinación incrementó a los 3 meses, seguida por 9 meses, siendo las recién colectadas las que presentaron la menor velocidad de germinación; las almacenadas por 6 meses, mostraron diferencias estadísticamente intermedias con las recién colectadas (Fig. 19). Tanto la capacidad germinativa como la velocidad de germinación no se redujeron respecto a las semillas recién colectadas, por lo que se infiere no se indujo la latencia durante el almacenamiento, ya que las semillas germinaron al tener las condiciones adecuadas (Gardner *et al.*, 1985).

Tanto la reducción del contenido de humedad, el mantenimiento de la viabilidad (superior al 68%) y los altos porcentajes de germinación (superior al 80 %) indican que *H. concolor* presenta semillas ortodoxas, las cuales son capaces de tolerar la desecación a bajos contenidos de humedad (2 a 5%) (Gold *et al.*, 2004), manteniendo una alta viabilidad y poder germinativo.

Con respecto a las cuatro características evaluadas en las semillas almacenadas: contenido de humedad, viabilidad, porcentaje y velocidad de germinación, el análisis global muestra que la calidad de las semillas no se vio afectada por el tiempo de almacenamiento, y que la mejor temperatura para

almacenar semillas de *Habranthus concolor* es a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2.7$), al ser práctica y económica, sin embargo, ya que el contenido de humedad tiene una enorme incidencia para la conservación del lote y afecta directamente a la longevidad de la semilla (Graviotto, 2018), se sugiere para futuros estudios emplear frascos herméticos, con un desecante (como sílica gel) para mantener un bajo contenido de humedad y posibilitar así el almacenaje de semillas por más de 9 meses.

8.1.5 Priming o acondicionamiento

En todos los tratamientos la germinación al día seis superó el 85%, excepto en auxinas 100 ppm con el 60% (Fig. 20) y el control (semillas no tratadas) con 40%. Al día 10 se alcanzó el porcentaje máximo de germinación superior al 92%. Con base en el análisis de KW no hay diferencias significativas en los tratamientos utilizados ($H=7.64$, $P=0.5698$), sin embargo sí se presentaron diferencias significativas en los días en que germinaron las semillas, donde cada día el porcentaje de germinación fue significativamente diferente, excepto al día 8 y 10 ($H=274.21$, $P=0$) (Fig. 20).

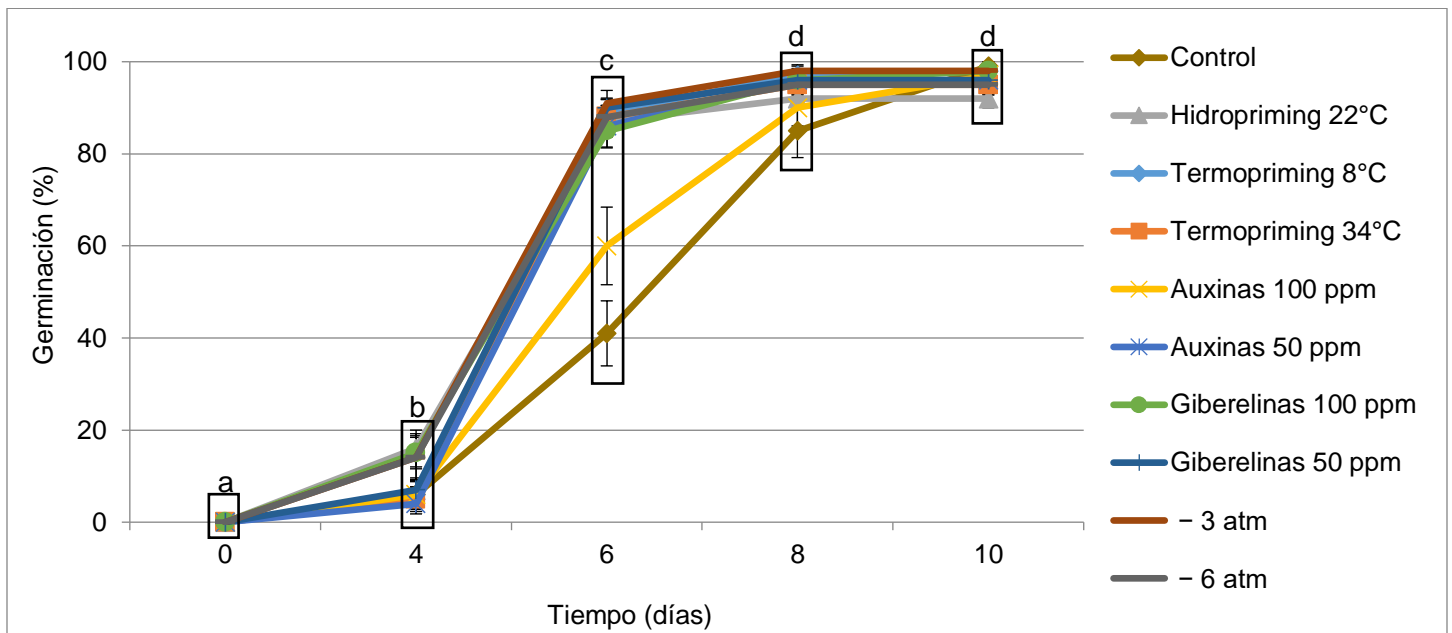


Figura 20. Porcentaje de germinación de semillas acondicionadas con diferentes tratamientos (\pm e.e). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$).

8.1.5.1 Velocidad de germinación

Se encontraron diferencias significativas ($F=4.37$, $P=0.0001$), siendo -3 atm y giberelinas 100 ppm los mejores tratamientos, seguidos del hidropriming y -6 atm, en contraste con el control y el tratamiento de auxinas 100 ppm, que presentaron la menor velocidad de germinación (Fig. 21).

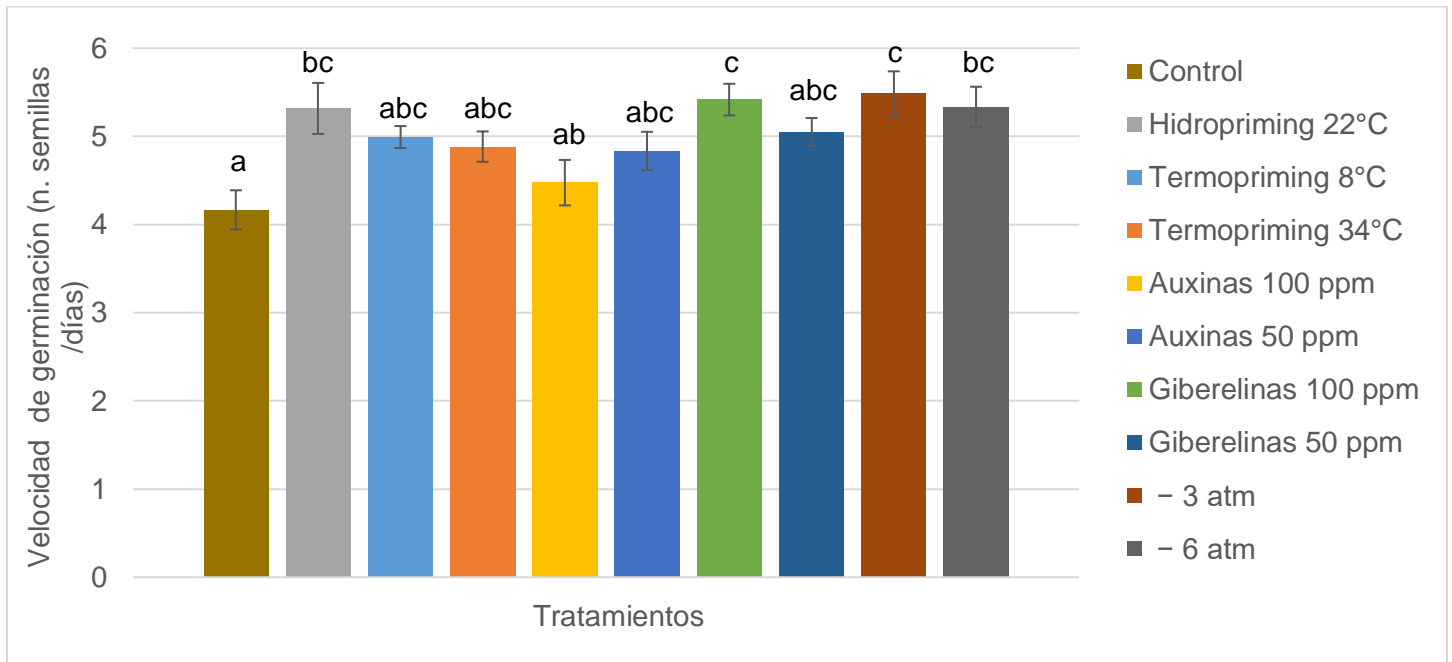


Figura 21. Velocidad de germinación (número de semillas/días) de semillas acondicionadas (\pm e.e). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$).

8.1.5.2 Sobrevivencia

La respuesta de las semillas al acondicionamiento también se evaluó con la sobrevivencia de las plántulas. Después de año y medio el porcentaje más alto de sobrevivencia lo registró el hidropriming y -6 atm (con 52%) en contraste con los tratamientos de auxinas (ambas concentraciones) y -3 atm con 21% de sobrevivencia (Cuadro 1). Sin embargo en todos los tratamientos hubo una severa disminución en la sobrevivencia, por lo que habría que evaluar diferentes condiciones para lograr incrementarla.

Cuadro 1. Sobrevivencia de plántulas (%) provenientes de semillas acondicionadas después de un año y medio.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)
Control	43
Hidropriming 22°C	52
Termopriming 8°C	30
Termopriming 34°C	26
Auxinas 100 ppm	16
Auxinas 50 ppm	14
Giberelinas 100 ppm	35
Giberelinas 50 ppm	38
- 3 atm	21
- 6 atm	52

Las semillas acondicionadas se pueden deshidratar por determinado periodo de tiempo y con la rehidratación se logra revigorizar semillas envejecidas, incrementando y acelerando la germinación en comparación con las semillas no tratadas (Heydecker *et al.*, 1973, Sánchez, *et al.* 2001). Los diferentes tratamientos para el acondicionamiento de semillas de *Habranthus concolor*, no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación alcanzado respecto al control y entre los tratamientos aplicados, ya que para el día 10, se logró el máximo poder germinativo, superando el 92%. Sin embargo se observó un ligero retraso en el proceso germinativo en las semillas control y las acondicionadas con 100 ppm de auxinas (Fig. 20). Como se mencionó anteriormente, otro objetivo del

acondicionamiento es acelerar la germinación; al medir la velocidad de germinación se encontró que los mejores tratamientos fueron -3 atm y giberelinas a 100 ppm, seguidos del hidropriming y -6 atm. El tratamiento de osmopriming empleó manitol ($C_6O_6H_{14}$) un componente orgánico de bajo peso molecular (Parera y Cantliffe, 1994) a dos diferentes potenciales hídricos: -3 y -6 atm, obteniendo resultados estadísticamente similares (Fig. 21). En cuanto al uso de agentes acondicionantes, distintos estudios han observado que al utilizarlos, se incrementa la cantidad de semillas germinadas respecto a las no tratadas (Thanos y Georgtrou, 1988; Sánchez *et al.*, 1997).

Se ha observado que el ingreso de agua a las semillas a gran velocidad durante la imbibición puede producir estrés dañando al embrión, y cuando la solución de preincubación tiene elevada concentración de sales, el agua ingresa más lentamente, lo que resulta en una disminución del daño (Alvarado y Bradford, 1988 Heydecker y Coolbear, 1977 en Furque *et al.*, 2015). Los agentes osmoacondicionantes interfieren con los mecanismos de germinación mediante el tipo y concentración de la sustancia osmoacondicionante, la temperatura y tiempo de imbibición, produciendo modificaciones bioquímicas y biofísicas relacionadas con la germinación, especialmente en las etapas tempranas (Thanos y Georgtrou, 1988; Giménez *et al.*, 1993).

En las semillas, enzimas como amilasas, proteasas y en algunos casos lipasas, juegan un rol vital en el crecimiento y desarrollo temprano del embrión. Cualquier incremento en la actividad de estas enzimas, podría resultar en un crecimiento inicial vigoroso y buen establecimiento de los cultivos. Se ha demostrado que el osmopriming afecta la actividad de estas enzimas en la germinación de las semillas en diferentes plantas (Nawaz *et al.*, 2013).

Las hormonas vegetales utilizadas pertenecen al grupo de las giberelinas y auxinas: biogib (ácido giberélico, AG, A3 ó AG3) y ácido indol-3-burílico (IBA), respectivamente, sin embargo, únicamente el tratamiento hormonal con giberelinas 100 ppm incrementó la velocidad de germinación respecto al control, siendo el segundo tratamiento más veloz (Fig. 21). Los reguladores vegetales, son sustancias

sintéticas que pueden incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal, aumentando la absorción y utilización de agua y nutrientes en las plantas, estimulando la división, diferenciación y elongación de las células (Vieira y Castro, 2002).

En esta investigación, se observó que la velocidad de germinación se incrementó con la mayor concentración de hormonas vegetales (giberelinas 100 ppm), mientras que a la concentración menor (50 ppm) la disminuyó (Fig. 21). Por un lado, estudios de Ghodrat y Roustá (2012), han observado que la aplicación de ácido giberélico no tuvo ningún efecto en la germinación de las semillas de maíz, sin embargo, en determinadas concentraciones aumentaba la longitud de brotes y raíces. Por otro lado, se observó en semillas de calabaza, que el acondicionamiento con GA3 reducía considerablemente los días de germinación (Shahzad, *et al.*, 2014), al igual que en *Leymus chinensis*, donde incrementó la germinación, promoviendo el crecimiento subsecuente de la planta, así como la producción de biomasa (Ma *et al.*, 2018). Se observó que la respuesta en la velocidad de germinación de la semilla cambió tanto con los distintos tratamientos empleados, como dependiendo de la concentración utilizada.

El hidropriming además de alto porcentaje de germinación, fue el tercero más veloz en germinar. Esto es relevante ya que es el tratamiento más económico al sólo embeber las semillas en agua durante 24 h y posteriormente deshidratarlas. (Fig. 21). Nawaz *et al.*, (2013), indican que el hidropriming en las semillas tiene efectos que promueven el crecimiento de las plántulas en etapas iniciales y posteriores al desarrollo, además de tener efectos benéficos en la actividad enzimática, necesarios para la rápida germinación de la semilla. El desarrollo de las plántulas posterior a la germinación, está influenciado por distintos factores, como lo es el vigor de la semilla, la expresión genética, o bien el tratamiento previo que recibe la misma antes de ser sembrada (priming) (Nawaz *et al.*, 2013). Al realizar tratamientos pregerminativos, además de promover la germinación de las semillas e incrementar la velocidad de las semillas germinadas, también se debe tomar en cuenta el desarrollo y sobrevivencia de las plántulas obtenidas, por lo que se midió el porcentaje de las plántulas sobrevivientes, después

de un año y medio, encontrando que el hidropriming y el osmopriming a -6 atm tuvieron mayor porcentaje de sobrevivencia de plantas con 52% (Cuadro 1).

El desarrollo exitoso de la semilla depende de múltiples influencias en todos y cada uno de los estados de su formación (Doria, 2010), por lo que factores internos y externos se encargan de modular la respuesta que tiene una semilla a distintos tratamientos, es por esto que se deben considerar las condiciones ambientales en el cual se desarrolla la planta madre, ya que esta repercutirá en las características de las semillas utilizadas. Es posible que las semillas de *H. concolor* tuvieran un acondicionamiento natural por las lluvias aisladas que se pueden presentar en las semillas maduras previo a su dispersión.

Damián-Domínguez (2010), evaluó la fenología reproductiva en *H. concolor*, reportando que con las primeras lluvias de abril, se inicia el desarrollo floral, además de distinguir las tres etapas por las que pasa el fruto: fruto temprano, joven y maduro, con una duración de 2, 11 y 9 días, respectivamente; siendo aproximadamente 22 días lo que tardan las semillas en madurar y comenzar la dispersión, tiempo suficiente para que las semillas en proceso de maduración se encuentren en una constante hidratación y secado, tanto por las lluvias típicas en verano (inclusive a finales de la primavera), como por las horas de sol que reciben las semillas al interior del fruto. Se infiere que es debido a este “acondicionamiento natural” que en las semillas de *H. concolor* no se logró observar un aumento en el porcentaje de germinación, únicamente un ligero incremento de la velocidad, aunado a la buena calidad de los lotes de semillas colectadas al tener 70% de viabilidad y alto porcentaje germinativo (90%).

Con el análisis global de los tratamientos de priming aplicados, se puede determinar que tanto el osmopriming a -6 atm como el hidropriming, son las mejores opciones para acondicionar las semillas de *H. concolor*. Ambos tratamientos presentaron alto porcentaje germinativo, alta velocidad de germinación y alto porcentaje de sobrevivencia de las plantas después de año y medio, no obstante,

si lo que se busca es reducir los costos en la propagación de las semillas, se recomienda aplicar el hidropriming, al requerir únicamente agua, evitando así el costo del manitol.

8.1.6 Fotoblastismo

La respuesta germinativa de las semillas en diferentes condiciones de luz es similar y para el día cinco en todos los tratamientos la germinación superó el 92%. Con base en la prueba KW no se encontraron diferencias significativas entre las distintas condiciones de luz utilizadas ($H=3.1528$, $P=0.3686$), lo cual indica que semillas de *H. concolor* responden como indiferentes. El factor que determinó diferencias significativas fue el tiempo (días) ($H=88.0139$, $P=0$) (Fig. 22).

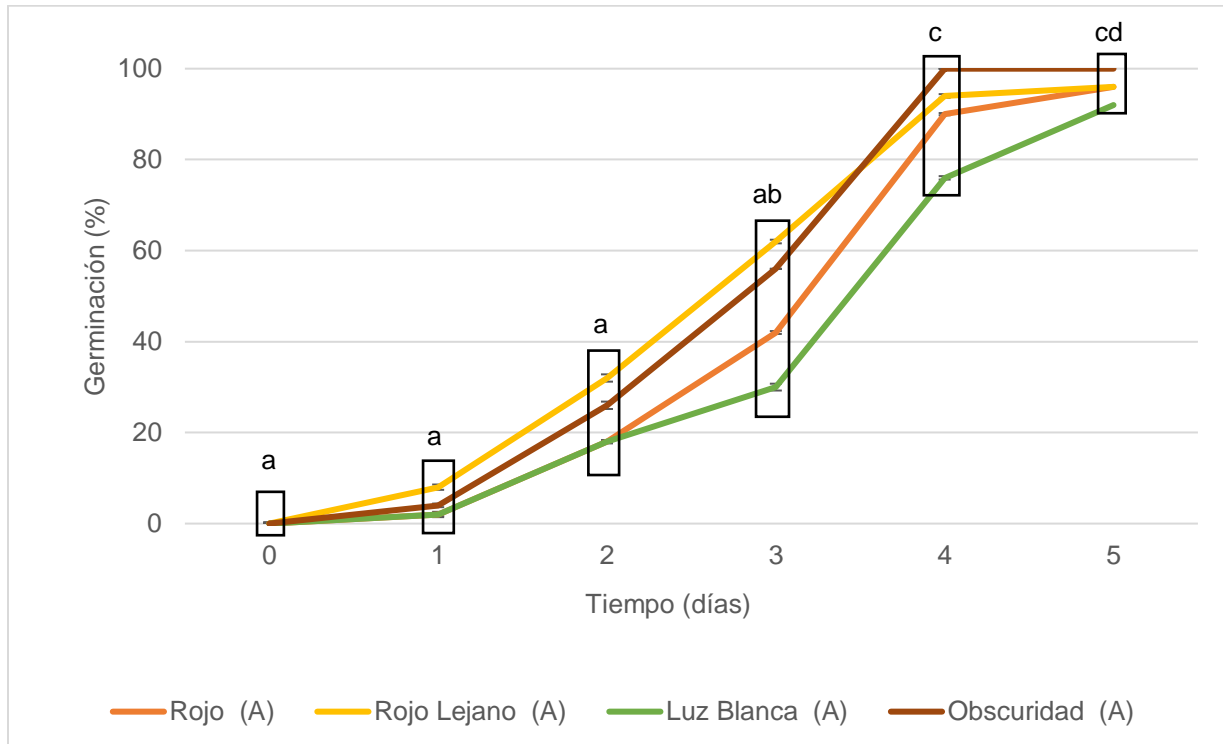


Figura 22. Porcentaje de germinación en diferentes condiciones lumínicas (\pm e.e). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

La importancia central de la luz en las plantas no se limita únicamente a la captación y transducción de energía mediante la fotosíntesis; las plantas pueden distinguir entre las diversas informaciones de la luz (intensidad, cualidad o proporción entre diversas longitudes de onda, dirección y duración). De este modo, las plantas han desarrollado mecanismos sensores para captar las señales lumínicas del medio, las cuales provocan cambios metabólicos y fisiológicos que abarcan distintas fases del ciclo biológico, entre ellas: germinación, desarrollo vegetativo, latencia, floración entre otras (Barceló *et al.*, 2001).

Come (1970), clasifica la respuesta de las semillas a la luz en tres grupos: 1) fotoblásticas positivas, las cuales no germinan en condiciones de obscuridad, 2) fotoblásticas negativas, donde la germinación se ve inhibida por la presencia de luz y 3) indiferentes, que reaccionan neutralmente a los estímulos lumínicos. *H. concolor* corresponde a este tercer grupo, ya que en las cuatro condiciones de luz utilizadas, las semillas presentaron un porcentaje de germinación superior al 72% y para el día 5 del 92 al 100% de las semillas habían germinado, sin mostrar diferencias significativas entre los tipos de luz utilizadas (Fig. 22).

Echeverría y Alonso (2010), evaluaron la respuesta lumínica y reportan a las semillas de *Habranthus gracilifolius* como fotoblásticas neutras. Bowers (2000), señala que el fotoblastismo positivo es una característica fisiológica que podría favorecer la formación de un banco de semillas en el suelo. Posiblemente las especies fotoblásticas neutras, no tienen la habilidad de formar bancos de semillas, ya que pueden germinar en la obscuridad, sin embargo, no sólo la luz favorece la formación de bancos de semillas, también influye la temperatura y humedad del ambiente (Jurado y Flores, 2005; Flores *et al.*, 2016).

8.1.7 Fenología

Con los experimentos realizados, se obtuvo la siguiente fenología de *H. concolor*, abarcando desde la fase de semilla, su germinación y posterior formación y maduración de hojas y bulbos (Fig. 23):

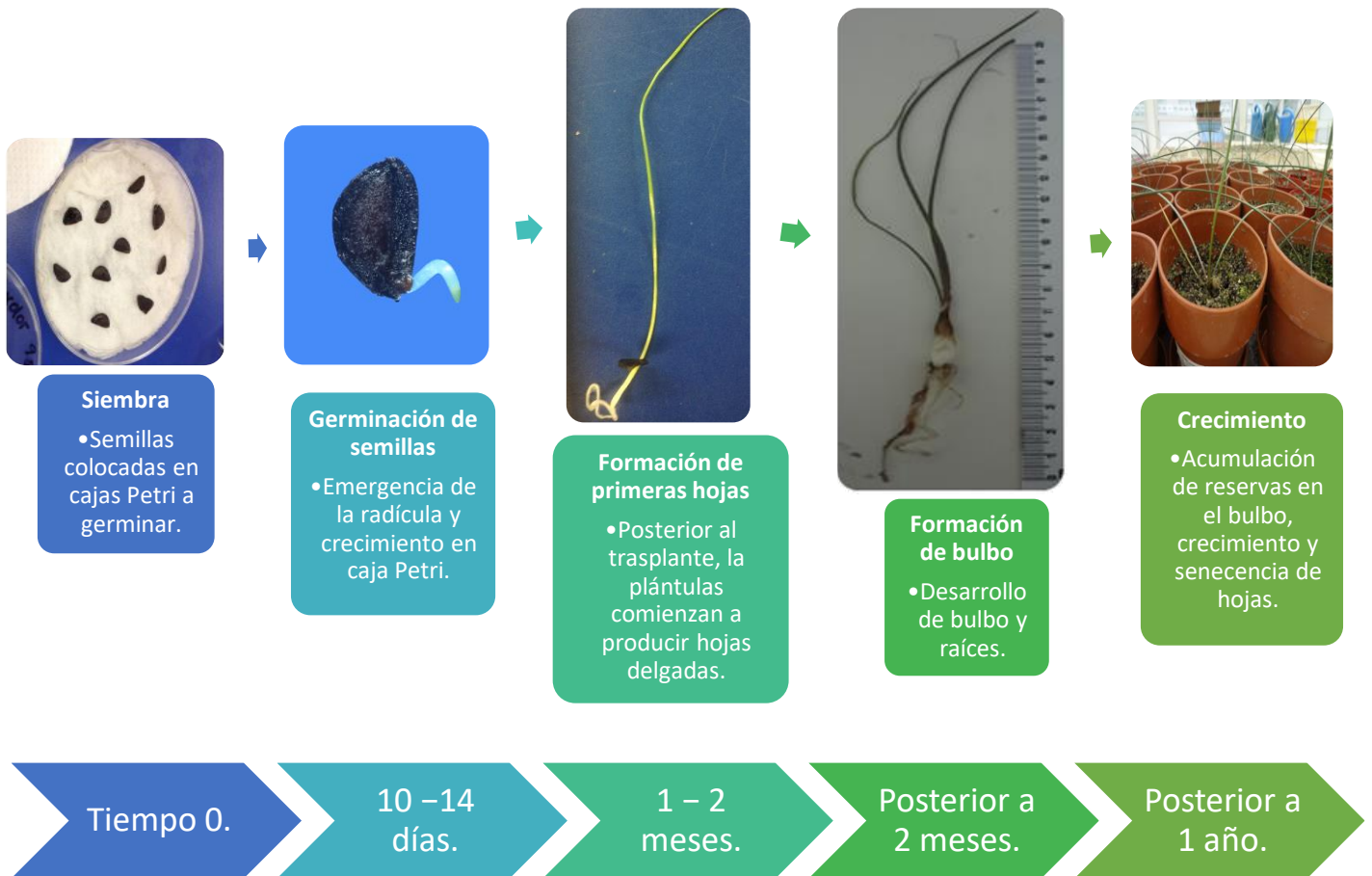


Figura 23. Fenología de *H. concolor*.

A partir del desarrollo experimental realizado, se obtuvo la fenología de *Habranthus concolor* hasta el primer año y medio de vida. Se colocaron las semillas a germinar en cajas Petri, requiriendo únicamente 15 días para alcanzar su máxima capacidad germinativa. Posteriormente, a 45 días de la germinación (o tras alcanzar una longitud entre 10 y 15 cm), las plántulas fueron trasplantadas a semilleros, con sustrato de agrolita, vermiculita y tierra negra (proporción 1:1:1), en este punto se observó la raíz y primeras hojas verde brillante en los individuos, remarcando la ausencia del bulbo. Las plántulas continuaron su desarrollo en el semillero, hasta que después de siete meses, fueron nuevamente trasplantadas a macetas independientes, encontrando plantas con raíces, un bulbo pequeño (inferior a los 0.7 cm de diámetro transversal) y presencia de hojas más gruesas y verde opaco. Notando con el trasplante el lento crecimiento de la especie (Fig. 23).

8.2 Propagación asexual

8.2.1 Características de los bulbos

Se utilizó un total de 78 bulbos de *Habranthus concolor* para la propagación asexual (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de bulbos empleados para la propagación asexual (\pm e.e.).

	Invernadero 2010	Rescate 2017
Diámetro (cm)	3.16 \pm 0.12	4.44 \pm 0.04
Altura (cm)	3.90 \pm 0.10	4.90 \pm 0.05
Biomasa (g)	21.81 \pm 2.38	48.75 \pm 1.21
Número de bulbos	29	49

8.2.2 Análisis general de los tratamientos

Se observó diferente respuesta con base en el origen de los bulbos utilizados para la propagación. 41% de los bulbos provenientes del Invernadero 2010 se pudrieron y sólo 39% formó nuevos bulbos, mientras que los del Rescate 2017 únicamente se pudrió el 14% y 64% formaron nuevos bulbos (Fig. 24).

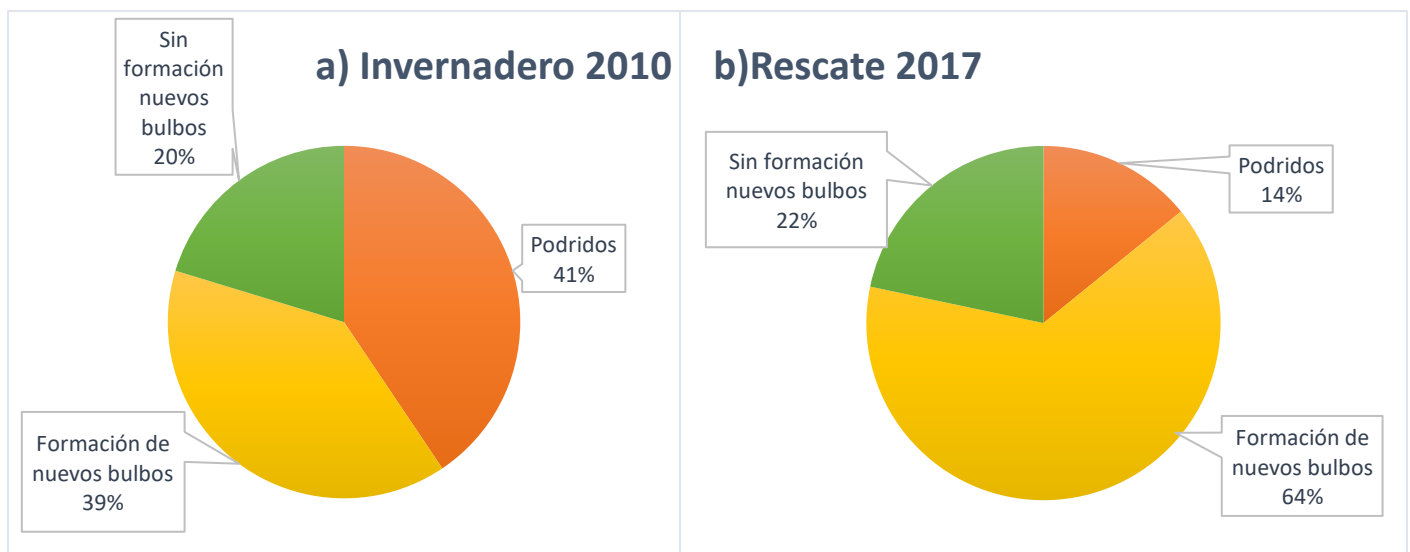


Figura 24: Propagación asexual de *H. concolor* a través de bulbos.

8.2.2.1 Bulbos

El tipo de corte empleado para la propagación asexual de *H. concolor* mostró diferencias significativas en cuanto a la formación de nuevos bulbillos ($F=8.15$, $P=0$), siendo el corte de escamas externas sin AIB (tratamiento 2, Rescate 2017) el que produjo en promedio más de cuatro bulbos por repetición, seguido del tratamiento 14 con más de tres bulbos (medios longitudinales sin AIB, Rescate 2017). En contraste, el control (1) y la sección basal sin y con AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente), no formaron nuevos bulbillos y el tejido se mantuvo vivo, lo mismo ocurrió con las escamas externas e internas con AIB (tratamientos 4 y 5, respectivamente) sin formación de nuevos individuos, debido a los altos porcentajes de putrefacción (Figs. 25 a 28).

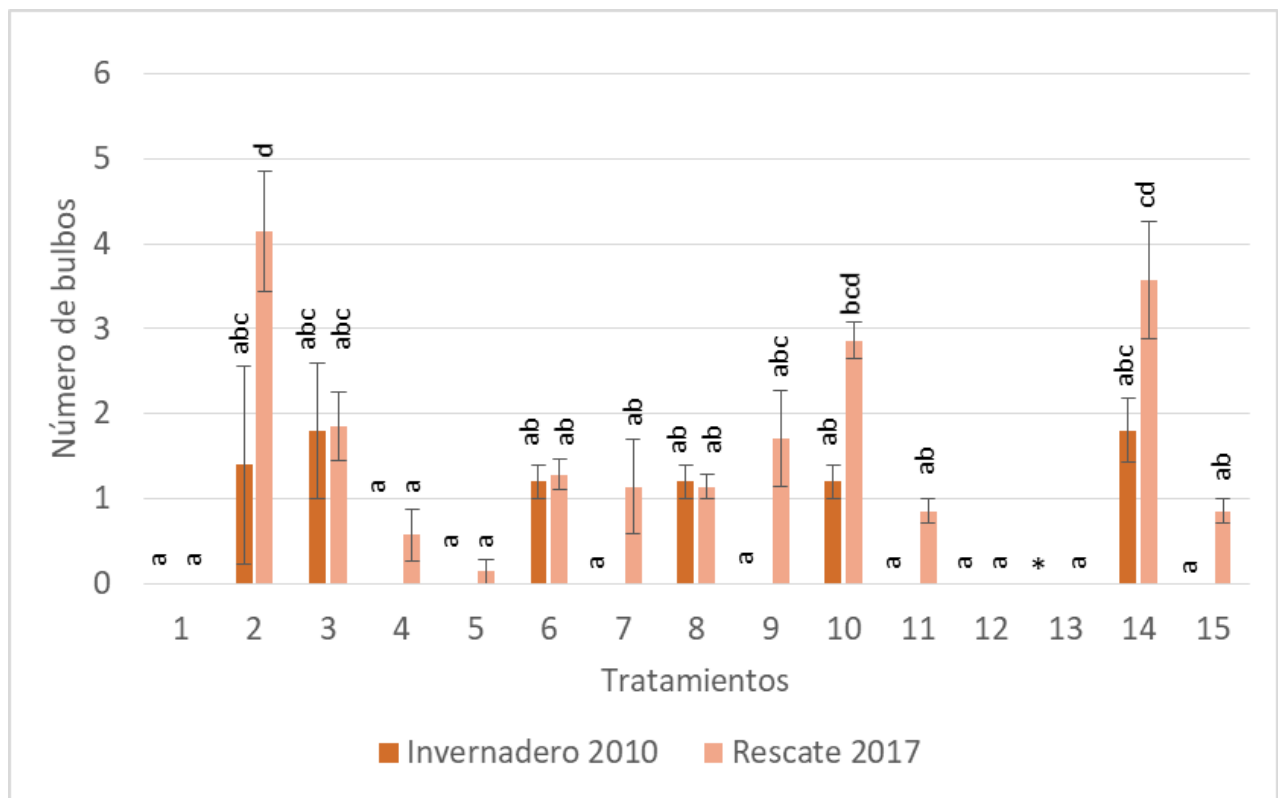


Figura 25. Número de bulbos formados por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.



Figura 26. Formación de nuevos bulbos del Rescate 2017 a partir del corte escamas externas sin AIB (tratamiento 2), se observan bulbos unidos surgiendo del disco basal, así como la formación de hojas independientes y raíces compartidas.



Figura 27. Bulbos del Rescate 2017 obtenidos a partir de medios longitudinales sin AIB (tratamiento 14) con la formación de nuevos individuos pequeños a partir del segmento inicial, unidos al disco basal donde surgen, con escaso desarrollo radicular y hojas pequeñas y delgadas.



Figura 28. Desarrollo del explante de bulbos Rescatados 2017 con el corte por mitad de la sección basal sin AIB (tratamiento 10). Presenta bulbillos saliendo del disco basal, pequeños y deformes, así como desarrollo foliar con hojas verdes y delgadas.

Se midió el diámetro transversal y la altura de los bulbos propagados, encontrando diferencias significativas ($F=41.71$, $P=0$); el control (1) y la sección basal sin y con AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente), mostraron diámetros superiores a los 3 cm, en comparación con el resto de los tratamientos, con bulbillos inferiores a 1.5 cm (Figs. 29 a 32).

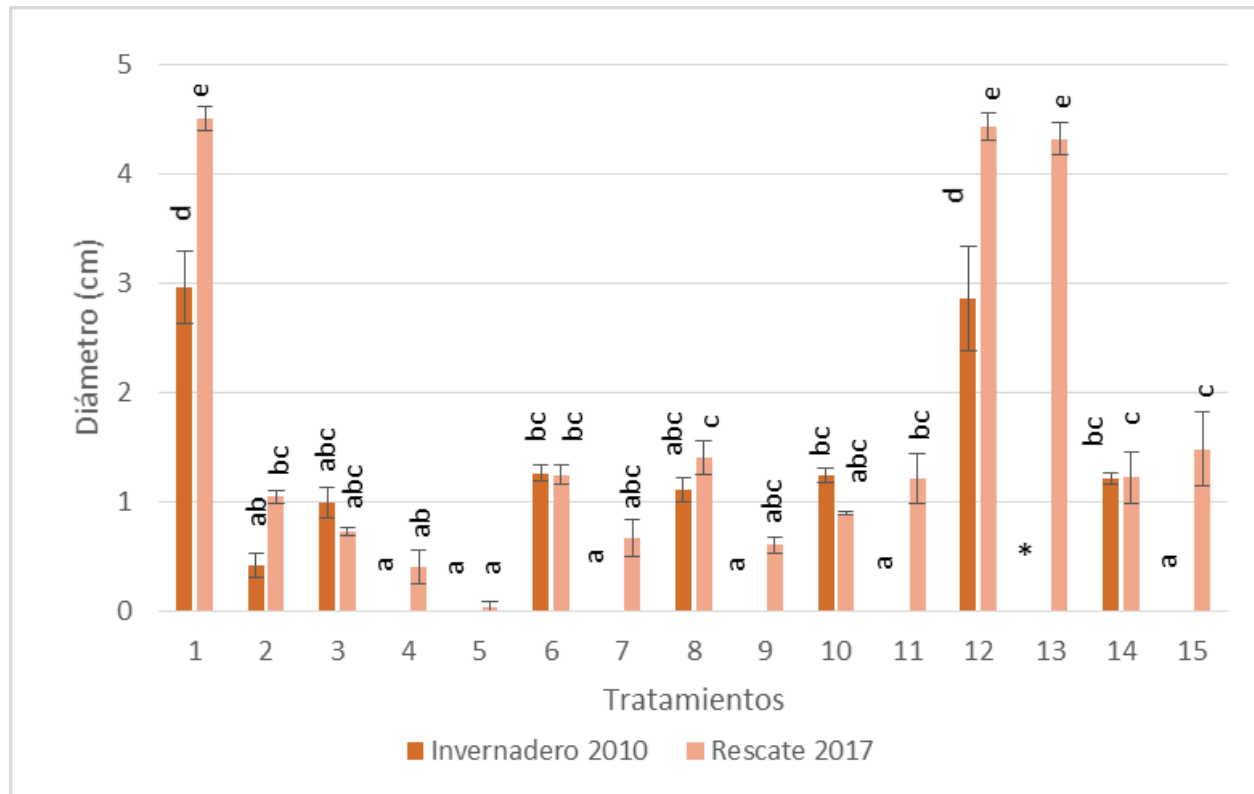


Figura 29. Diámetro transversal de los bulbos formados por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.

La altura de los bulbos mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=24.32$, $P=0$). Los bulbos presentaron una tendencia a longitudes inferiores de 3 cm de longitud. Los bulbos de mayor altura fueron el control (1) y los tratamientos 12 y 13, sin embargo, no mostraron una clara diferencia entre el resto de los tratamientos (Figs. 30 a 32).

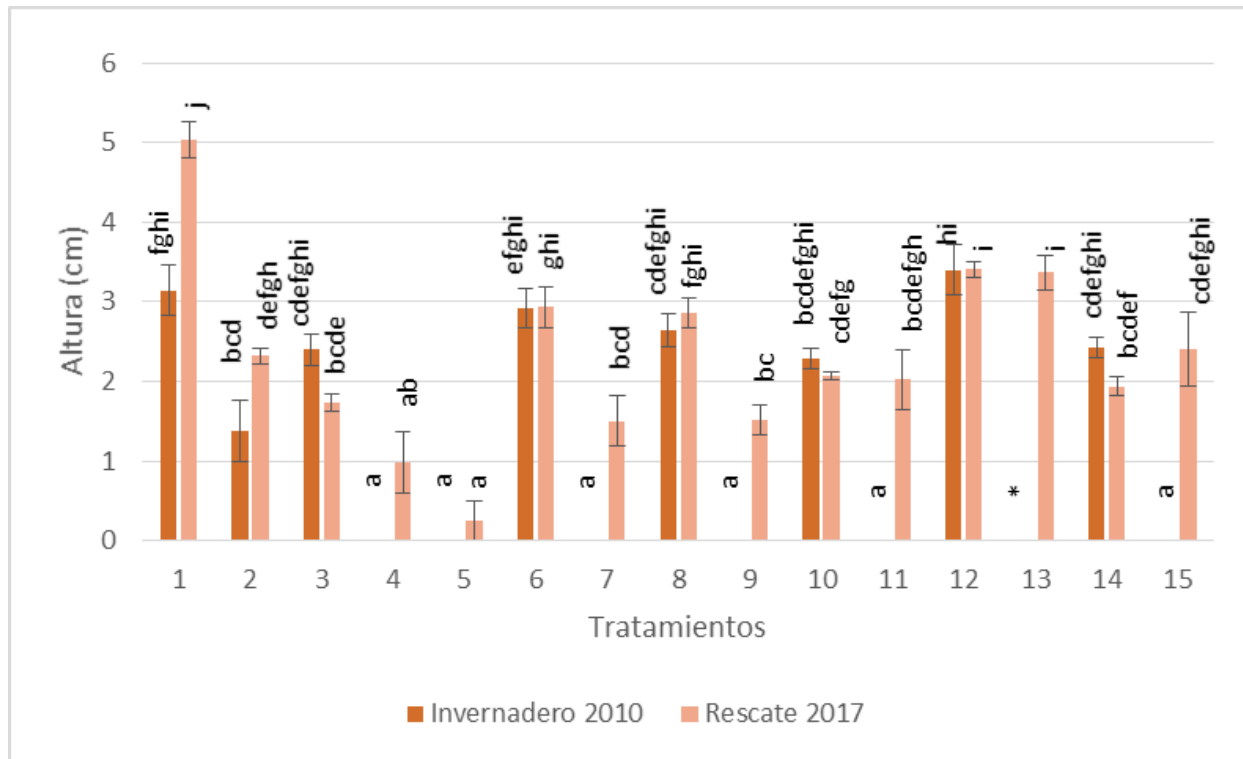


Figura 30. Altura de los bulbos formados por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. La altura de los bulbos mostró similitudes en la mayoría de los tratamientos, excepto en el 12, 13 y control con bulbos de mayor altura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.



Figura 31. Formación de nuevos bulbillos a partir del corte escamas externas sin AIB (tratamiento 2) del Rescate 2017, los bulbos son pequeños, con un diámetro inferior a 1 cm, y altura no mayor a 2 cm, unidos y surgiendo entre las catáfilas.



Figura 32. Corte de la sección basal sin AIB (tratamiento 12) Rescate 2017, donde no se da la formación de nuevos bulbillos, únicamente la cicatrización del tejido y desarrollo radicular y foliar.

8.2.2.2 Hojas

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=5.02$, $P=0$). Todos los tratamientos presentaron escaso desarrollo foliar, con la formación de una hoja por bulbillo, excepto el control (1) del Invernadero 2010 con un desarrollo promedio tres hojas (Fig. 33).

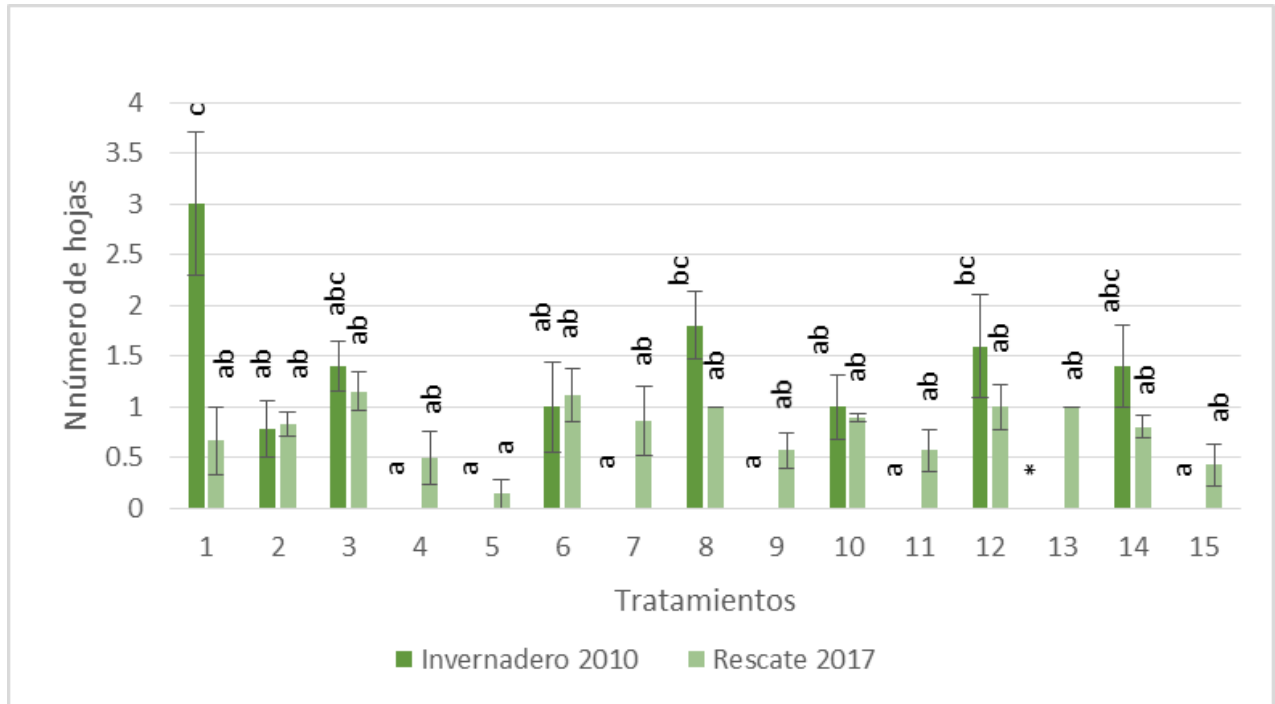


Figura 33. Número de hojas formadas por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.

La longitud de las hojas mostró diferencias significativas ($F=4.16$, $P=0$). Las hojas más largas las desarrollaron el control (1) (Invernadero 2010) y el corte de la sección basal en cuartos sin AIB (tratamiento 8) (Rescate 2017), superiores a 24 cm de longitud. El resto de los tratamientos fueron inferiores a 15 cm de longitud (en caso de presentarlas) (Fig. 34).

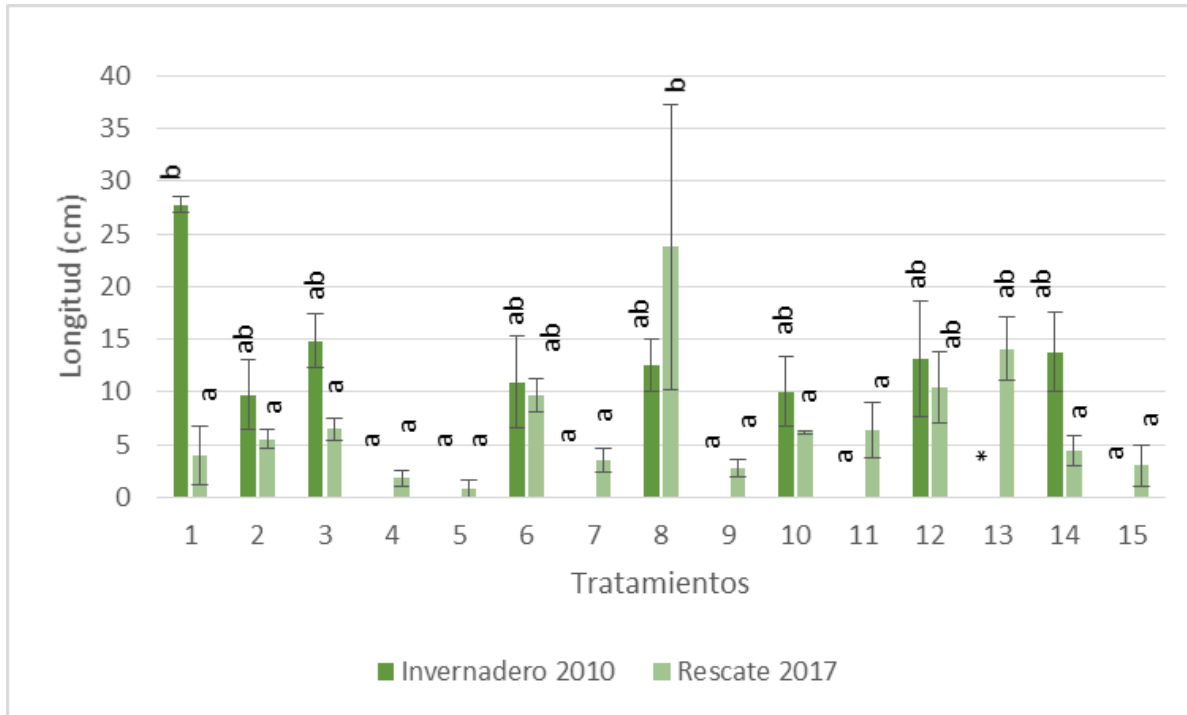


Figura 34. Longitud de las hojas formados por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. En general las hojas desarrolladas fueron menores a 15 cm de longitud, excepto el control y tratamiento 8) tuvieron las hojas más largas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.

El grosor de las hojas desarrolladas mostró diferencias significativas ($F=11.44$, $P=0$). Únicamente el control y el corte de la sección basal sin y con AIB (tratamiento 12 y 13, respectivamente) superó los 0.7 cm de ancho, el resto de los tratamientos presentaron hojas inferiores a 0.3 cm (Figs. 35 a 37).

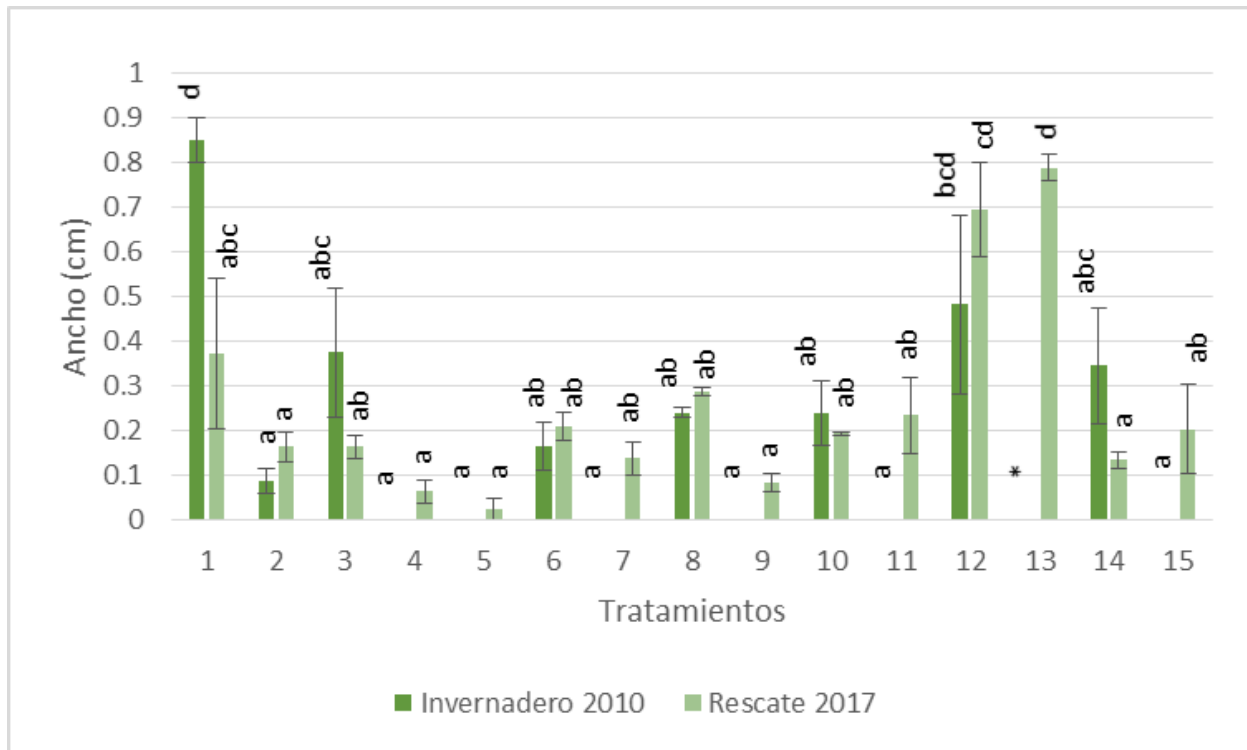


Figura 35. Ancho de las hojas formados por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. La mayoría de los tratamientos formaron hojas inferiores a 0.30 cm de ancho, en contras del control (1) y los tratamientos 12 y 13). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.



Figura 36. Bulbos en proceso de cicatrización del corte a la sección basal sin AIB Invernadero 2010 (tratamiento 12), con raíces y hojas largas y gruesas, algunas verdes, en su mayoría senescentes.



Figura 37. Bulbos control del Rescate 2017, con una hoja verde, larga y gruesa, así como desarrollo radicular escaso y túnica cubriendo al bulbo.

8.2.2.3 Raíces

El desarrollo radicular fue similar en todos los tratamientos, únicamente las diferencias significativas se presentaron en la sección basal con y sin AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente) con mayor formación de raíces ($F=23.1$, $P=0$). Los cortes de escamas externas e internas con AIB (tratamientos 4 y 5, respectivamente) tuvieron nulo desarrollo de raíces (Fig. 38).

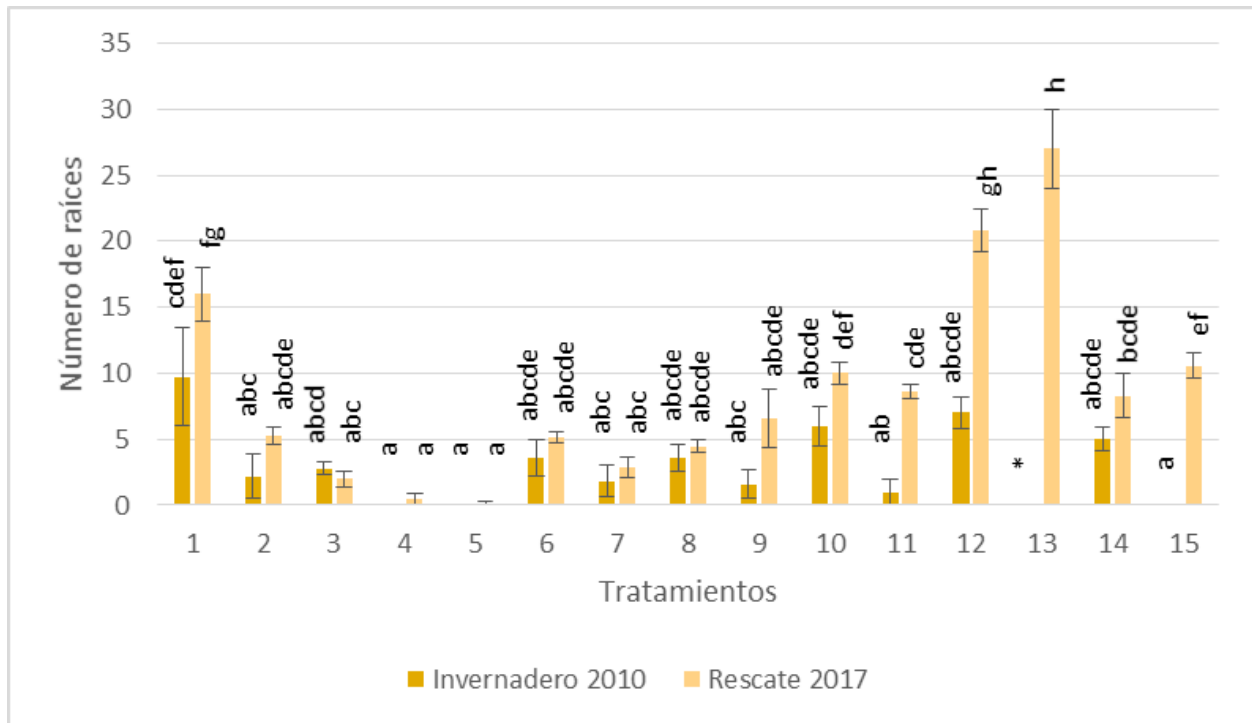


Figura 38. Desarrollo radicular por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Usando bulbos de Invernadero 2010 y Rescate 2017. Los tratamientos con mayor número de raíces fueron el 12 (Rescate 2017) y 13 con mayor formación de raíces que el resto, resaltó el nulo desarrollo radicular en los tratamientos 4 y 5. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.

La longitud de las raíces en los tratamientos tuvo en general una respuesta homogénea (menores de 5 cm). Las diferencias significativas se debieron al corte de las escamas externas e internas con AIB de ambos orígenes (Tratamientos 4 y 5, respectivamente), prácticamente sin la formación de raíces (F=15.87, P=0). También se presentó una baja producción radicular para los cortes: longitudinal en cuartos con AIB, corte de la sección basal en cuartos con AIB y corte por mitad de la sección basal con AIB (tratamientos 7, 9 y 11, respectivamente) en bulbos de Invernadero 2010 (Figs. 39 y 40).

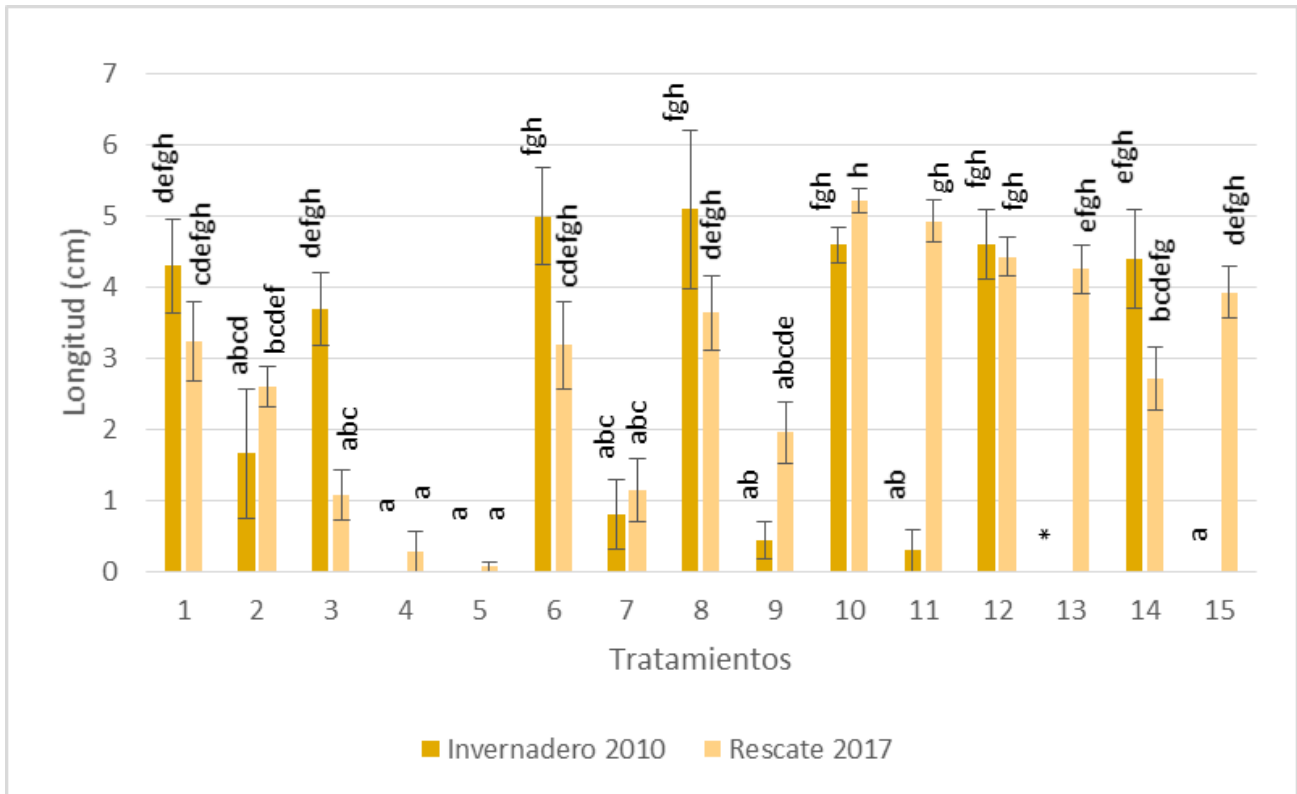


Figura 39. Longitud de las raíces formadas por cada tratamiento: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. Letras diferentes denotan diferencias significativas (P<0.05). *No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.



Figura 40. Corte de la sección basal con AIB (tratamiento 13) Rescate 2017, se observan bulbos en proceso de cicatrización, desarrollo radicular, así como presencia de hojas verdes anchas.

8.2.2.4. Biomasa

La biomasa de los bulbos en los diferentes tratamientos fue similar excepto en los cortes de escamas externas e internas con AIB (tratamientos 4 y 5, respectivamente) que presentaron putrefacción; tanto el control como los cortes a la sección basal sin y con AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente) mostraron el mayor peso de los explantes ($F=42.49$, $P=0$, Anexo 3) (Fig. 41). Todos los tratamientos del Rescate 2017 mostraron mayor biomasa, en comparación con los provenientes del Invernadero 2010, por lo que el control (1) y los tratamientos 12–15 tienen mayor peso al tratarse de fragmentos iniciales de mayor tamaño (Fig. 41).

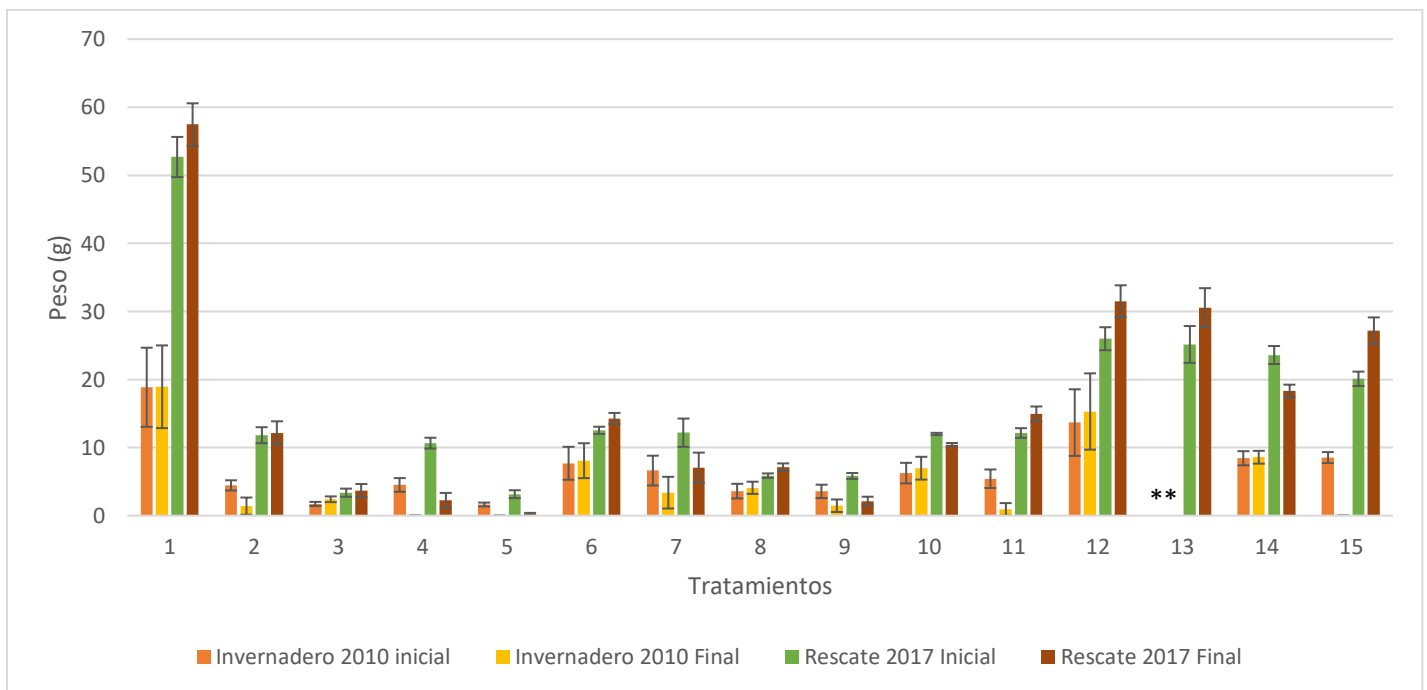


Figura 41. Biomasa de bulbos *H. concolor*: 1) control, 2) escamas externas sin AIB, 3) escamas internas sin AIB, 4) escamas externas con AIB, 5) escamas internas con AIB, 6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, 7) corte longitudinal en cuartos con AIB, 8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, 9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, 10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, 11) corte por mitad de la sección basal con AIB, 12) sección basal sin AIB, 13) sección basal con AIB, 14) medios longitudinales sin AIB y 15) medios longitudinales con AIB. $P<0.05$ (Anexo 3). ** No se realizó por falta de material del Invernadero 2010.

8.2.2.5 Floración y fructificación

Al concluir la fase experimental, los bulbos formados fueron trasplantados a un nuevo sustrato de tierra negra, agrolita y vermiculita (proporción 1:1:1). Posterior a 2 meses, los individuos (Invernadero 2010 y Rescate 2017) provenientes del control (1) y corte a la sección basal con y sin AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente) desarrollaron etapas de floración y fructificación (Fig. 42).



Figura 42. Floración y fructificación de individuos de *H. concolor*.

Los dos grupos de bulbos con los cuales se trabajó tuvieron diferente origen. El grupo que permaneció en condiciones de Invernadero (2010), no estuvieron sometidos a condiciones de estrés, tanto hídrico como a la presión por herbivoría ya que se encontraban en macetas al interior del invernadero, con un riego constante. En contraste, los bulbos del Rescate 2017, estuvieron en su ambiente natural, con fluctuantes, lluvias esporádicas y la presión de otros organismos.

Los bulbos presentaron diferencias en cuanto al tamaño, ya que los del Invernadero 2010 eran un centímetro menor (tanto en el diámetro como en la altura) en comparación con los del Rescate 2017, así como en biomasa, con del doble de tamaño (21.81 y 48.75 g respectivamente) (Cuadro 2). Otro factor que pudo haber influido en el tamaño es la edad de los bulbos, por lo que posiblemente los rescatados tenían más años de desarrollo.

Es importante hacer énfasis en el sustrato utilizado, una mezcla de agrolita y vermiculita (proporción 1:1). La agrolita y vermiculita son sustratos químicamente inertes, ya que su función se limita únicamente al soporte de las plantas, sin intervenir en la fijación y adsorción de nutrientes (Sáez y Narciso, 1999). Por lo que la respuesta de los explantes al tipo de corte aplicado dependió únicamente de las reservas al interior del bulbo, ya que el sustrato sólo fungió como soporte.

Los bulbos son tallos modificados en forma discoidal (aplanados), que almacenan nutrientes a través de hojas no fotosintéticas carnosas, lo cual les permite sobrevivir a condiciones adversas, estos pueden desprenderse de sus hojas fotosintéticas y alimentarse gracias a los nutrientes almacenados, por lo que el crecimiento se da empleando las reservas de azúcares y almidones (Abbott y Evans, 2006; González *et al.*, 2007). En general, se observaron mejores resultados en los bulbos del Rescate 2017, ya que fueron bulbos de mayor peso (Fig. 41) y presentaron mayor formación de nuevos bulbillos con un 64%, y un porcentaje de putrefacción sólo del 14 % (Fig. 24 b). Se infiere que esta respuesta estuvo directamente relacionada con el tamaño de los bulbos, donde aquellos de mayor tamaño

tuvieron mayor cantidad de reservas tanto para sobrevivir, como para llevar a cabo la formación de nuevos bulbillos a partir de los cortes realizados.

Los bulbos más pequeños del Invernadero 2010 (Fig. 41), tuvieron 41% putrefacción y solamente 39% formó nuevos bulbos (Fig. 24 a). A pesar del proceso de lavado y desinfección, así como el uso de antifúngico antes de la siembra no se impidió la putrefacción del material vegetal. Los diferentes cortes a los bulbos implica hacer heridas al tejido, facilitando la contaminación por hongos y bacterias, aunado al tamaño de los explantes, ya que al ser fragmentos muy pequeños, se dificulta la sobrevivencia de los segmentos a propagar.

En el centro de las hojas carnosas del bulbo se encuentra la yema apical del tallo, encargada de mantener la dominancia apical (González *et al.*, 2007). Tanto el control, como el corte a la sección basal con y sin AIB no desarrollaron nuevos bulbos (tratamientos 12 y 13, respectivamente) (Figs. 37, 32 y 40), ocasionando que a partir de ese fragmento sólo creciera una sola planta, debido a que la yema del centro del bulbo madre no se dañó, manteniendo así la dominancia apical y evitando el rebrote de las yemas axilares (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Andrade-Rodríguez, 2015). Esto lo observan diferentes autores (Schiappacasse *et al.*, 2002; Padilla-Sánchez *et al.*, 2016; Noguera *et al.*, 2017) al mantener intacta la yema principal con la propagación asexual de especies bulbosas.

Así mismo, en los tratamientos donde no se dañó la yema apical, tanto la formación de hojas, (longitud y ancho) (Figs. 33 a 37), el desarrollo radicular (número y longitud) (Figs. 38 y 39) y el tamaño del bulbo (diámetro y altura) (Figs. 28 y 29) fue donde se obtuvieron los mejores resultados ya que la yema apical se encarga principalmente de estimular el crecimiento del tallo (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015) y las reservas contenidas en el bulbo se encaminaron a llevar a cabo procesos de reparación y cicatrización celular, así como el desarrollo de hojas y raíces.

Los tipos de corte que produjeron mayor cantidad de bulbillos fueron de escamas externas sin AIB (tratamiento 2) (Fig. 26) con la formación de 4.1 bulbillos por segmento inicial, seguido de medios

longitudinales sin AIB (tratamiento 14) (Fig. 27) con 3.5 bulbillos, así como el corte por mitad de la sección basal (tratamiento 10) (Fig. 28) con 2.8 bulbos, todos provenientes del Rescate 2017 (Fig. 25). Se contrasta, que aquellos explantes con los mismos tratamientos, pero provenientes del Invernadero 2010, formaron menos de 2 bulbos por segmento (Fig. 25). Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015, explican que partir de un fragmento de bulbo madre inicial de mayor tamaño, mayor será la cantidad de reservas disponibles para la formación de nuevos bulbos. Aunado al tamaño, en el segmento inicial se dañó la yema apical con los cortes rompiendo la dominancia apical y estimulando el desarrollo de las yemas laterales presentes en el bulbo para la producción de nuevos bulbillos.

Es interesante resaltar que los tratamientos con mayor formación de bulbos (tratamientos 2, 14 y 10) también fueron aquellos que desarrollaron bulbos de menor tamaño, tanto en diámetro como en altura (Figs. 29 y 30). Zhu *et al.*, 2005 observan que cuanto más pequeños son los bulbos hijos de *Hippeastrum* al momento de la siembra, más pequeños son los bulbos generados, por lo que tardan más tiempo en alcanzar gran tamaño, incrementando el tiempo para obtener un bulbo maduro. Esto puede deberse a que existe determinada cantidad de reservas contenidas en el fragmento inicial, las cuales deben ser repartidas dependiendo la cantidad de bulbos producidos (Hanks, 1993; Zhu *et al.*, 2005; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015). Adicionalmente se observó buen desarrollo foliar y radicular en los tratamientos (Figs. 32, 36, 37 y 40).

En general, en los tratamientos evaluados (además del tipo de corte), la aplicación de AIB 1500 ppm respecto a aquellos que no fueron embebidos previamente, no mostraron diferencias significativas contundentes en el incremento de la formación de raíces (Fig. 38). El corte de la sección basal con y sin AIB (tratamientos 12 y 13, respectivamente del Rescate 2017), mostraron un ligero aumento en la cantidad de raíces formadas, sin embargo, no mostraron diferencias significativas contundentes ante el efecto del AIB (Figs. 32 y 40).

Las auxinas se encuentran relacionadas en procesos de división, crecimiento y diferenciación celular, jugando un papel importante en el desarrollo de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006). El AIB es una hormona sintética que promueve y acelera la formación de raíces adventicias en las plantas, utilizada en la horticultura para promover el enraizamiento de esquejes (Cueva, 2012; Báez- Pérez *et al.*, 2015). La concentración utilizada (1500 ppm), no favoreció el desarrollo radicular. Para futuros estudios se recomienda modificar la concentración de la hormona utilizada o bien probar con algún regulador vegetal del grupo de las citocininas, ya que éstas reducen la dominancia apical, promoviendo la formación de brotes y el crecimiento de yemas axilares (Howell *et al.*, 2003 en Jordán y Casaretto, 2006).

Se observó que sólo los bulbos a los cuales no se les dañó la yema apical, es decir el control, así como los tratamientos 12 y 13, llevaron a cabo procesos de floración y fructificación (Fig. 42). El corte de las hojas, raíces y bulbo (éste último excepto en el control), no modificó la madurez del bulbo, únicamente promovió la cicatrización del tejido y el uso de las reservas contenidas en el bulbo para desarrollar nuevamente órganos de absorción de nutrientes (raíces) y formación de hojas fotosintéticas, “recuperándose” del daño mecánico inducido, para posteriormente, continuar su desarrollo, por lo que los bulbos al encontrar condiciones favorables, rápidamente produjeron hojas y flores (González *et al.*, 2007).

En un análisis general de la propagación asexual de *H. concolor*, se pudo resaltar que aquellos cortes que inducen la formación de nuevos bulbos a partir del daño a la yema apical traen como consecuencia una reducción en el tamaño de los diferentes órganos de los bulbillos obtenidos, disminuyendo el tamaño no solo del bulbo propiamente dicho, sino el desarrollo foliar y radicular, obteniendo individuos juveniles, a partir de los cuales se sugiere dar seguimiento de su tasa de crecimiento anual, para saber así cuanto tiempo tardan en llegar a la etapa reproductiva.

Es muy interesante hacer un análisis comparativo de la propagación sexual a través de semillas y la propagación asexual mediante bulbos, ya que la primera implica mayor tiempo en alcanzar la madurez de los individuos (Fig. 23), al menos después de un año y medio se observaron individuos mucho más pequeños que los obtenidos a partir de la propagación vegetativa (Figs. 30 y 31) transcurridos únicamente 6 meses. Por lo que el lento crecimiento de *H. concolor* es un factor de suma importancia a considerar para la propagación de esta especie como una fuente de obtención de metabolitos secundarios (alcaloides) con interés medicinal.

Sin embargo, una opción para la obtención de material vegetal con fines medicinales sin afectar la madurez de los individuos de *H. concolor*, se observó en los tratamientos que no dañan la yema apical. Por un lado, el control permite la obtención de hojas y raíces, o bien la colecta del escapo floral o semillas, sin embargo, representan muy bajos niveles de biomasa. Por otro lado, la sección basal (tratamientos 12 y 13), permite mantener el desarrollo de las plantas intacto, mientras se obtiene la parte apical del bulbo, que es mayor peso, útil para los fines fitoquímicos de interés.

8.3 Fitoquímica

8.3.1 Cromatografía en capa fina

Las fases orgánicas (FO2) de los distintos órganos de *H. concolor*: R) raíz, B) bulbo, C) túnica, H) hojas, EF) escapo fresco, ES) escapo seco y S) semillas, analizadas por cromatografía en capa fina y reveladas con reactivo de Dragendorff resultaron positivas para alcaloides debido a la coloración naranja presente en las placas. Además se observaron con radiación UV a 254 nm y 365nm (Fig. 43).

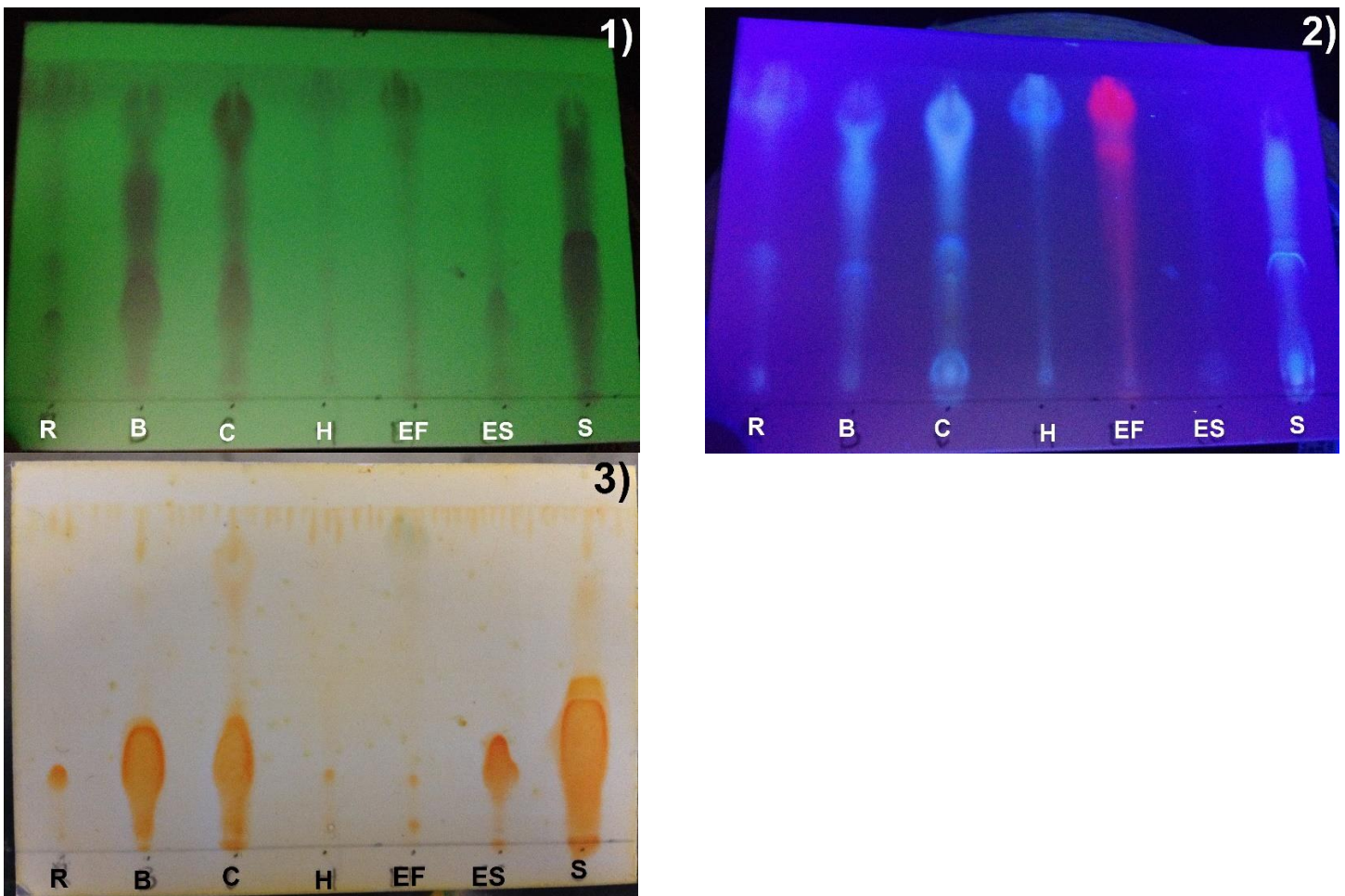


Figura 43: Cromatografía en capa fina de distintos órganos de *H. concolor*: R) raíz, B) bulbo, C) túnica, H) hojas, EF) escapo fresco, ES) escapo seco y S) semillas. Placas reveladas con: 1) 254 nm, 2) 365nm y 3) reactivo Dragendorff, dando positivo para alcaloides en todas las partes de la plantas.

8.3.2 Análisis mediante CG-EM.

El análisis por CG-EM permitió identificar 7 alcaloides de tipo Amaryllidaceae (Fig. 44), así como otros compuestos no identificados.

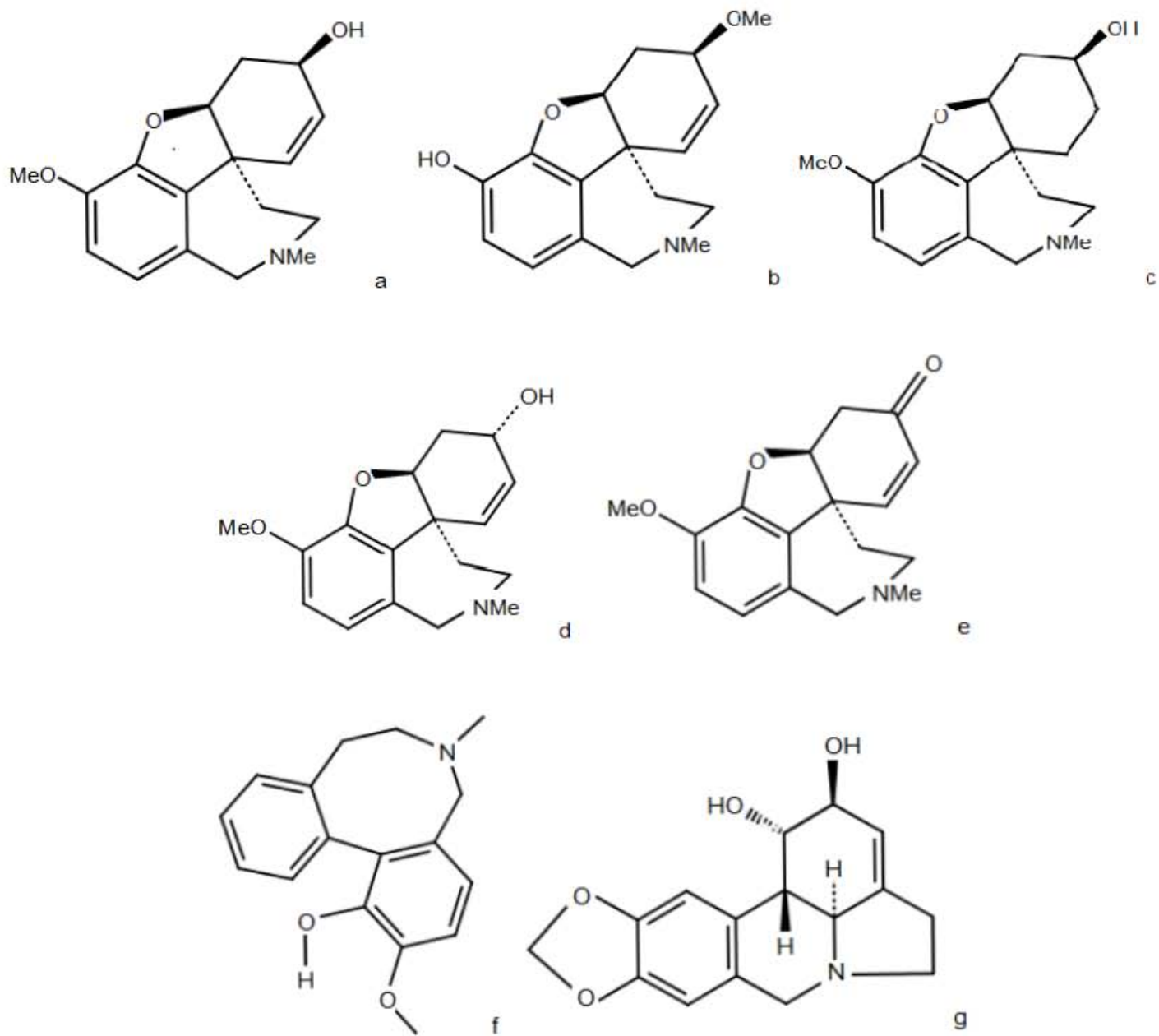


Figura 44. Estructura química de los alcaloides más importantes encontrados en las FO2 de *H. concolor*: **a)** Galantamina, **b)** Clidantina, **c)** Licoramina, **d)** Epigalantamina, **e)** Narwedina, **f)** Metil-apogalantamina y **g)** Licorina.

De los diferentes órganos de *H. concolor* se obtuvieron los cromatogramas donde cada pico corresponde a un compuesto (Figs. 45 a 51). Estos fueron identificados con base en sus espectros de masas a partir de comparación, ya sea por 1) los espectros de la base de datos NIST, o 2) los espectros reportados por Berkov *et al.*, (2012). Aquellos compuestos que no lograron ser identificados se describieron por la relación masa/carga (m/z) de su pico base/ion molecular (M^+).

Considerando la base de datos NIST, tanto la galantamina como la clidantina, fueron identificados como galantamina, ya que NIST no incluye la clidantina. Estos compuestos son isómeros estructurales, sólo varían en la posición del OH y del OMe y tienen el mismo peso molecular (287, $C_{17}H_{21}NO$). Sin embargo, ambos pudieron distinguirse con base en los distintos tiempos de retención (TR) y su patrón de fragmentación reportado (Berkov *et al.*, 2012). La galantamina presentó TR=15.56–15.66 y la clidantina TR=15.7–15.78. En el espectro de masas por impacto electrónico (EM-IM) de la galantamina los picos m/z (%) más importantes fueron: 287 M^+ (85%), 286(100%), 244, 216 (Fig. 52). El patrón de fragmentación de la clidantina fue: 287(100%) M^+ , 256(65) M^+ - OMe, 202(45), 115(42), 77(39) (Fig. 53).

La licoramina (TR=15.83), fue determinada por la base de datos NIST y corroborando con lo reportado por Berkov *et al.*, (2012) (Fig. 54). La epigalantamina (TR=16.2) no fue identificada por la base de datos NIST, por lo que se determinó por comparación con el espectro de masas obtenido y el reportado por Berkov *et al.*, (2012) (Fig. 55).

El compuesto (4aS,8aS)-3-Metoxi-11-metil-9,10,11,12-tetrahidro-4aH-benzo[2,3]benzofuro[4,3-cd]azepin-6(5H)-ona (determinado por NIST) fue identificado como sinónimo de la narwedina (TR=16.69), corroborado con lo reportado por (Berkov *et al.*, (2012) (Fig. 56); lo mismo ocurrió con el compuesto dibenzo[c,E]azocin-1-ol, 2-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidro- (determinado por NIST) el cual es un sinónimo de la metil-apogalantamina (TR=13.2) de acuerdo a PubChem (2019) (Fig. 57).

La licorina (TR=20.3) (Fig. 50), fue determinada por la base de datos NIST, y se corroboró lo reportado por Berkov *et al.*, (2012). (Fig. 58).

Los compuestos identificados por el NIST como: **1)** Metil galactosido (1S,2S,3S,4R,5R)-, 4TMS derivado, **2)** Metil esterato, **3)** Dihidrocodeina (300.2/301), **4)** 2-Naftalencarboxamida, N-(1,3-difenil-3-oxo-1-propenil)- (300.2/301), **5)** 6H-Dibenzo[b,d]piran-6-ona, 7,9-dihidroxi-3-metoxi-1-metil- (300) (273.2/300) y **6)** 3,4,4a,5,6,7-Hexahidro-9,10-dimetoxi-2-oxo-2H-dibenzo(a,c)cicloheptano, no presentaron ningún sinónimo por lo que se muestra el patrón de fragmentación de cada compuesto, con sus respectivas anotaciones (Anexos 4-9). Los compuestos no identificados por el NIST ni por comparación de su espectro de masas fueron reportados con base en su relación pico base/ion molecular cuyo patrón de fragmentación se describe en los Anexos 10-17.

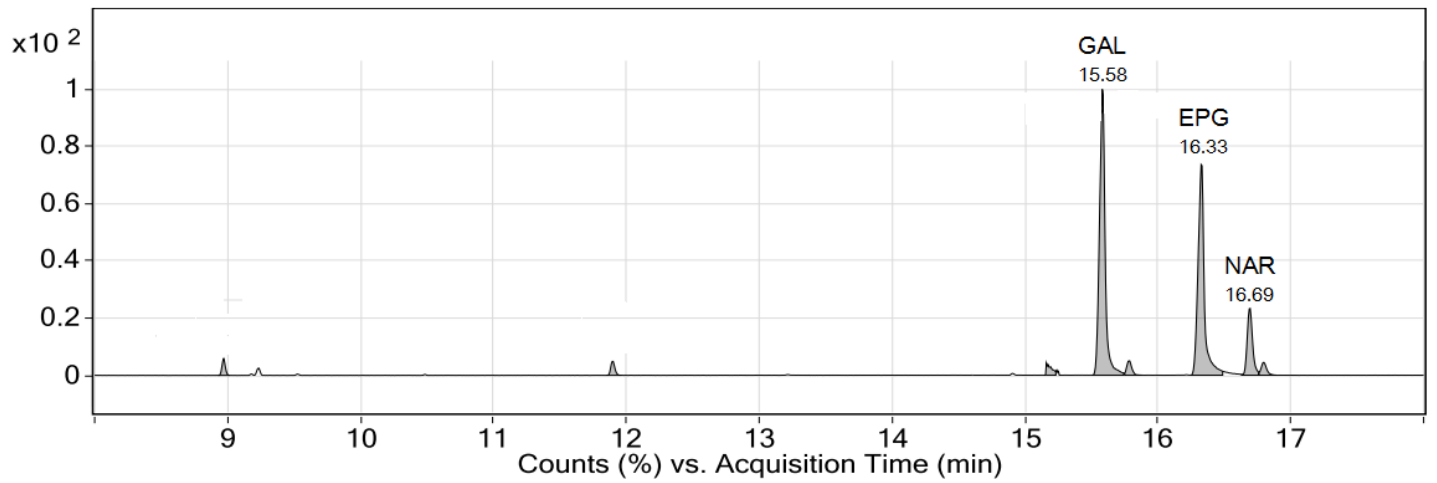


Figura 45. Cromatograma de la FO2 de bulbos de *H. concolor*, mostrando 8 picos, los principales: GAL: galantamina, EPG: Epigalantamina y NAR: Narwedina, y su respectivo tiempo de retención.

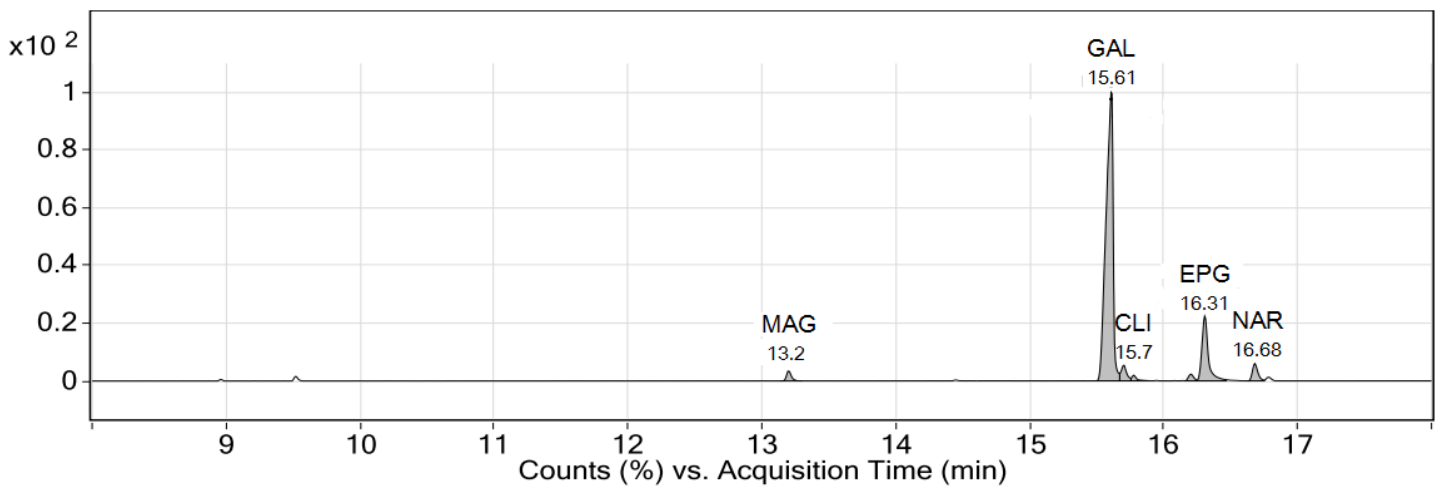


Figura 46. Cromatograma de la FO2 de túnica de *H. concolor*, mostrando 7 picos, los principales: MAG: Metil-apogalantamina, GAL: galantamina, CLI: Clidantina, EPG: Epigalantamina y NAR: Narwedina, y su respectivo tiempo de retención.

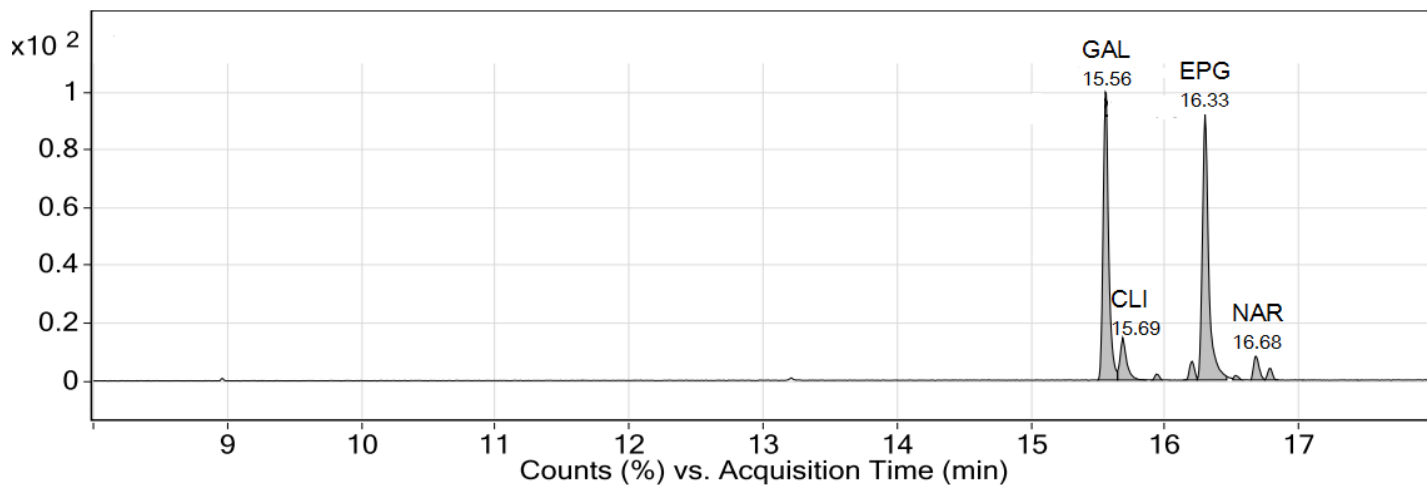


Figura 47. Cromatograma de la FO2 de hojas de *H. concolor*, mostrando 8 picos los principales: GAL: galantamina, CLI: Clidantina, EPG: Epigalantamina y NAR: Narwedina, y su respectivo tiempo de retención.

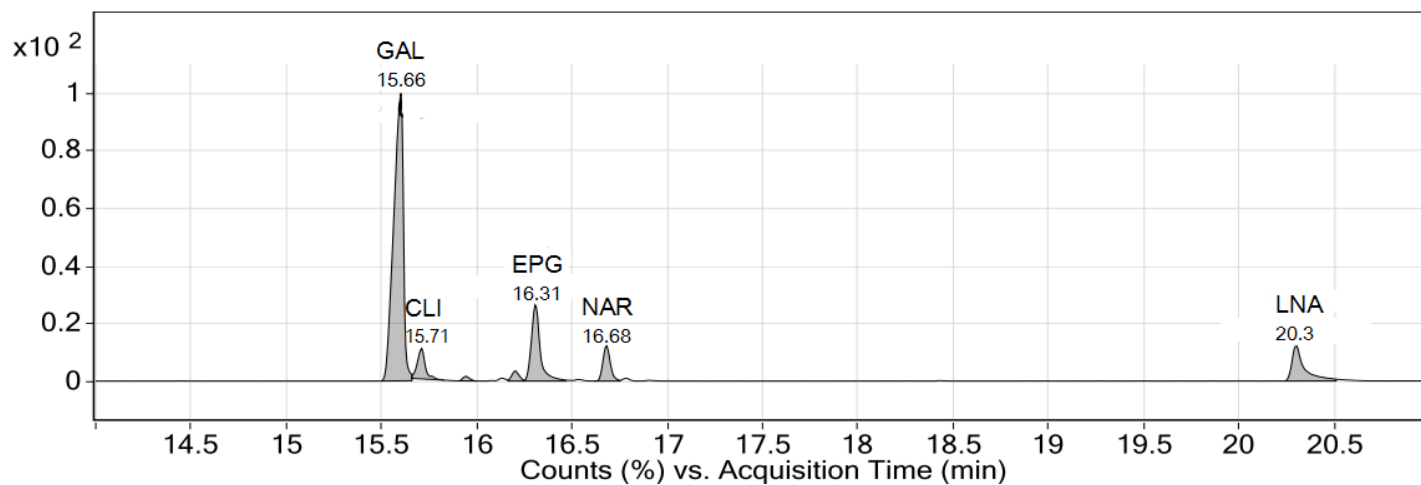


Figura 48. Cromatograma de la FO2 de raíces de *H. concolor*, mostrando 7 picos, los principales: GAL: galantamina, CLI: Clidantina, EPG: Epigalantamina, NAR: Narwedina y LNA: Licorina, y su respectivo tiempo de retención.

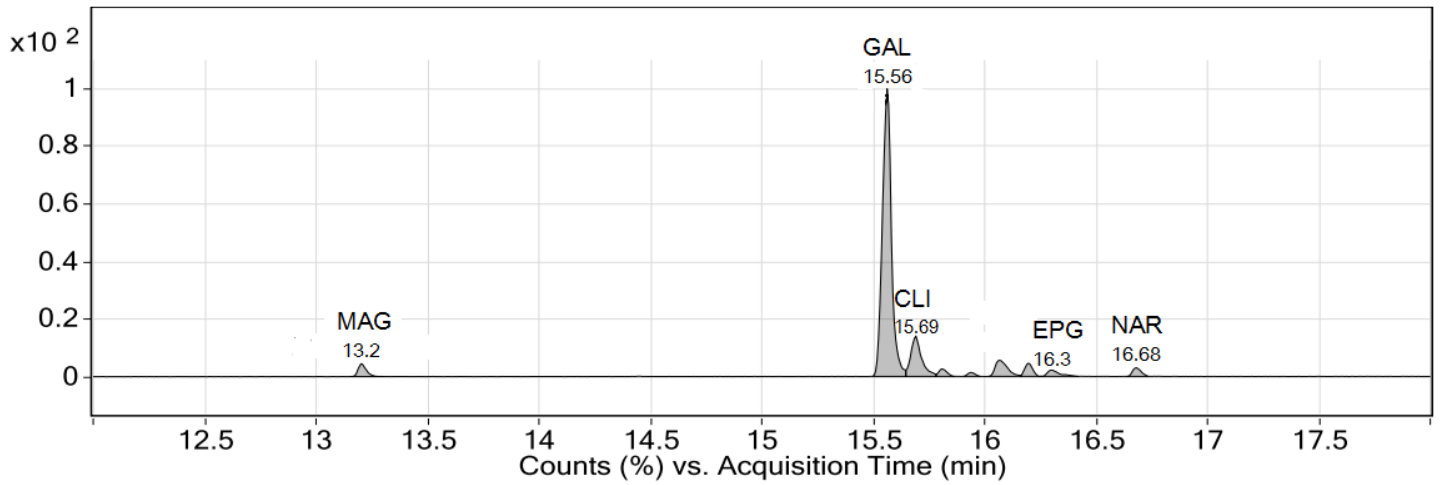


Figura 49. Cromatograma de la FO2 del escapo floral fresco de *H. concolor*, mostrando 9 picos, los principales: MAG: Metil-apogalantamina, GAL: galantamina, CLI: Clidantina, EPG: Epigalantamina y NAR: Narwedina, y su respectivo tiempo de retención.

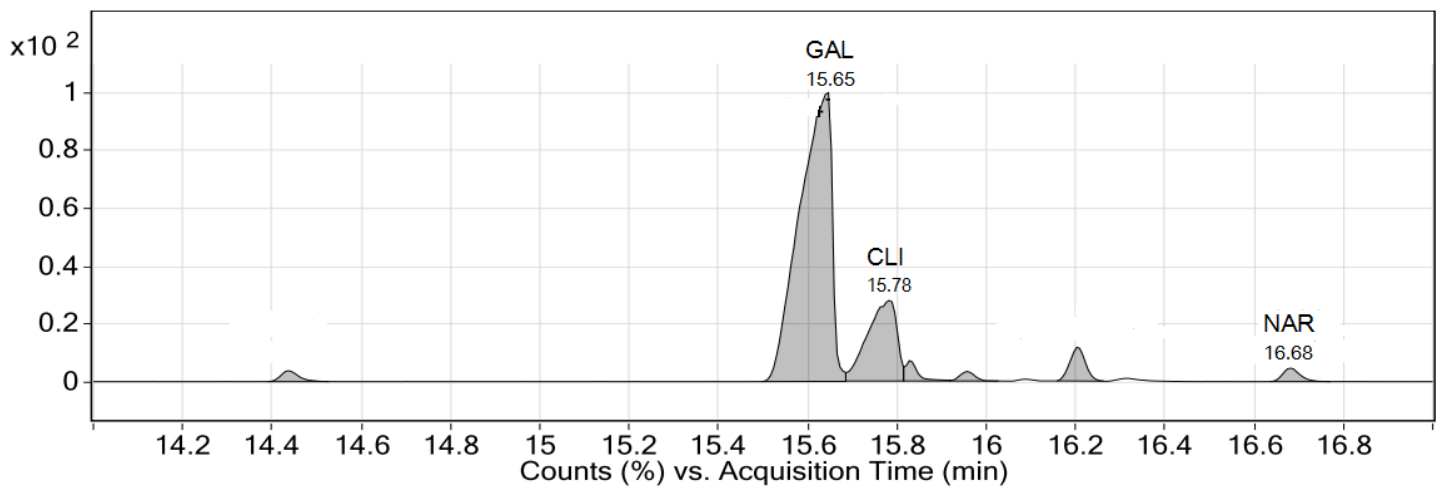


Figura 50. Cromatograma de la FO2 del escapo floral seco de *H. concolor*, mostrando 7 picos, los principales: GAL: galantamina, CLI: Clidantina y NAR: Narwedina y su respectivo tiempo de retención.

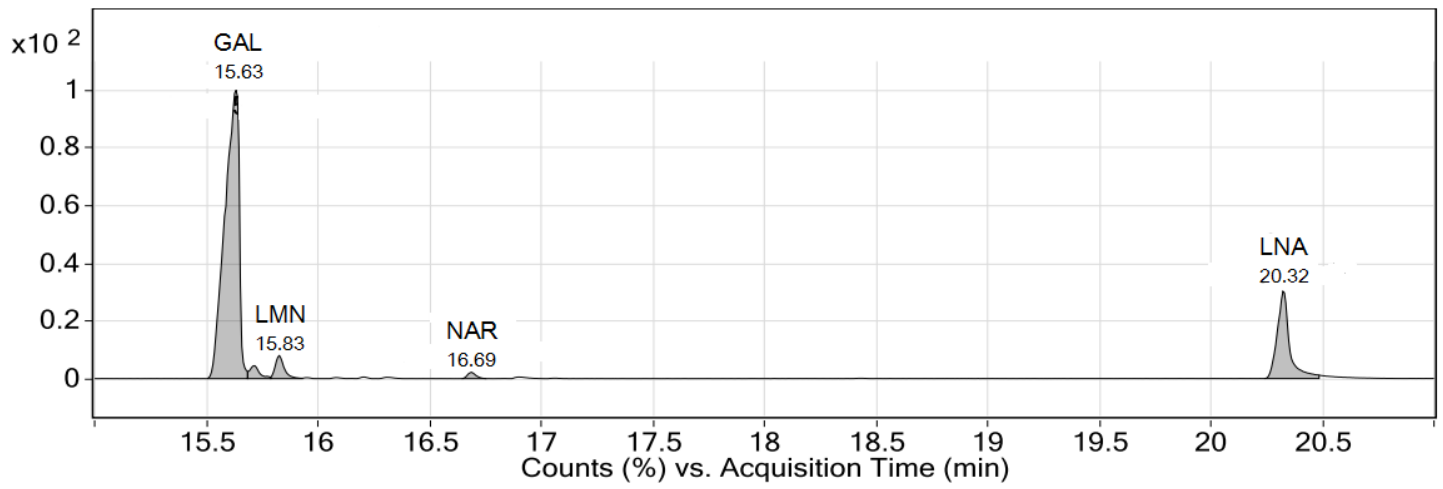


Figura 51. Cromatograma de la FO2 de semillas de *H. concolor*, mostrando 5 picos, los principales: GAL: galantamina, LMN: Licoramina, NAR: Narwedina y LNA: Licorina y su respectivo tiempo de retención.

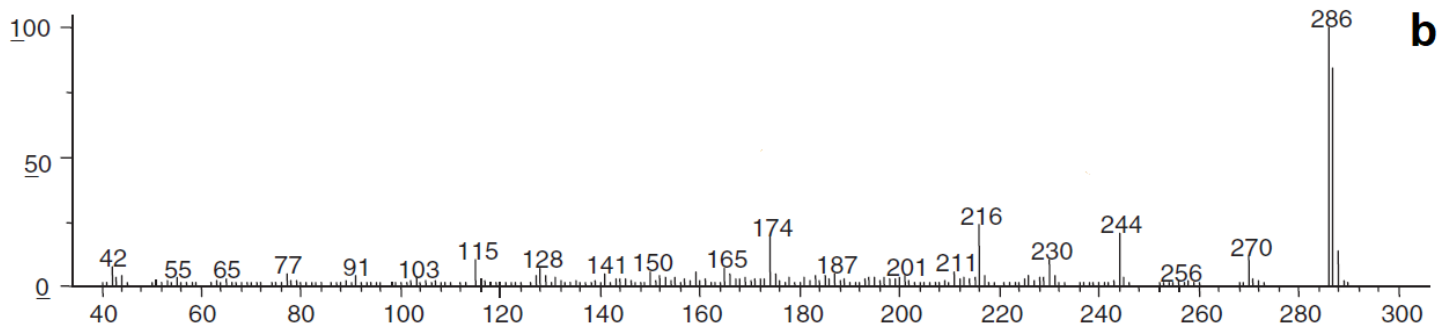
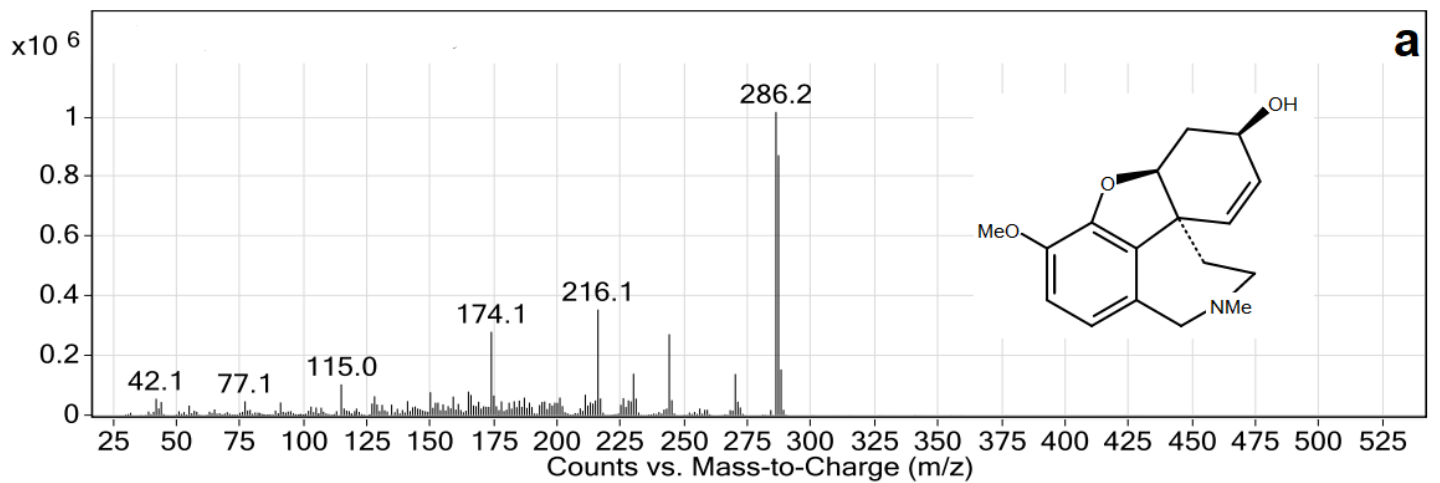


Figura 52. Espectro de masas de galantamina. **a)** Experimental de la FO2 del escapo floral fresco (TR=15.56), patrón de fragmentación (m/z): 287 M⁺ (85%), 286(100%), 244 (27.5%) 216 (40.6%). **b)** Tomado de Berkov *et al.*, 2012, modificado Soriano-García (2019).

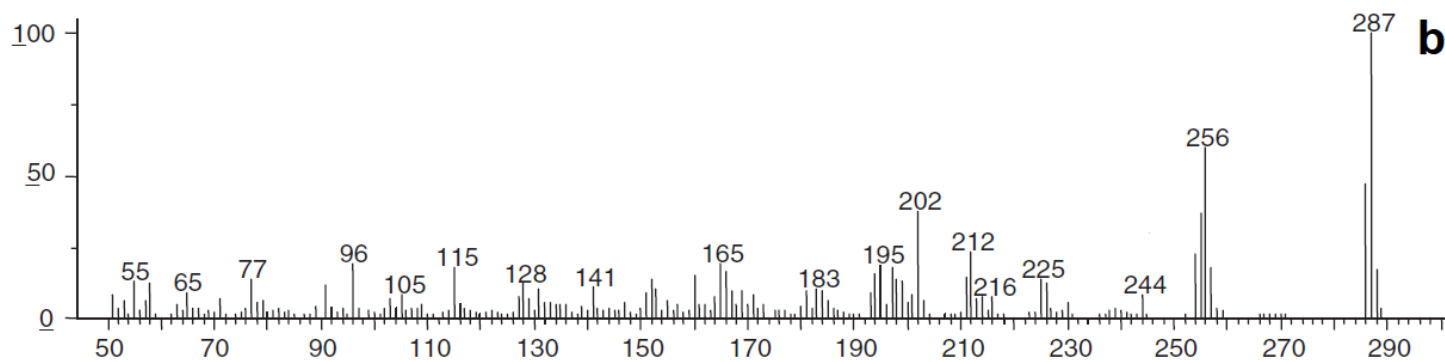
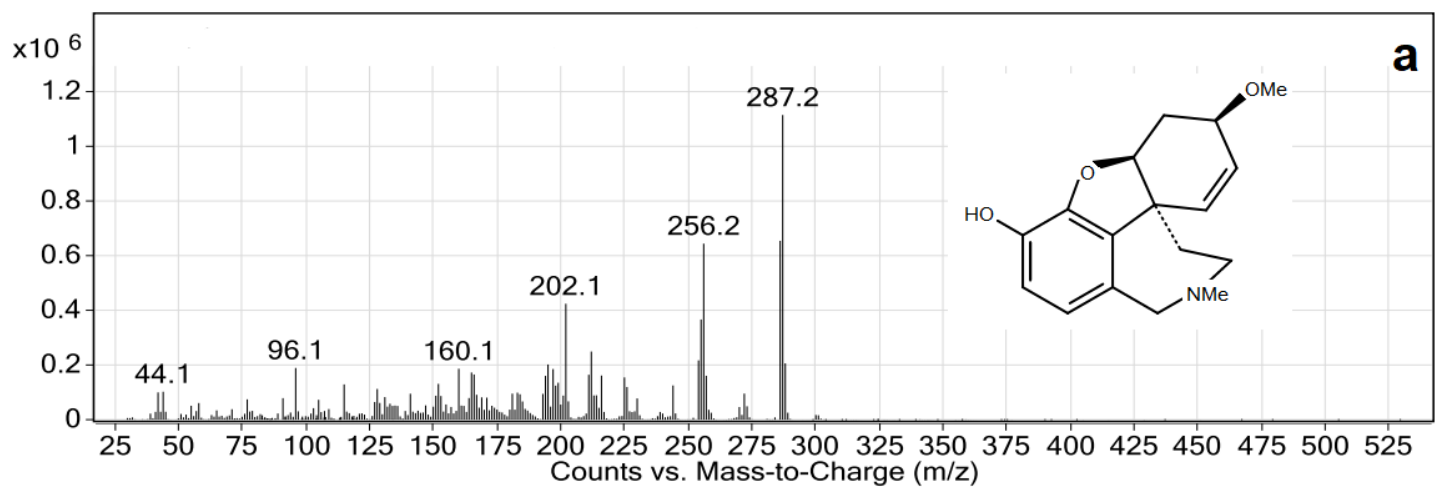


Figura 53. Espectro de masas de clidantina. **a)** Experimental de la FO2 del escapo floral seco (TR=15.78), patrón de fragmentación (m/z): 287.2 (100%) M⁺, 256.2 (65), 202(45), 115(42). **b)** Tomado de Berkov *et al.*, 2012, modificado Soriano-García (2019).

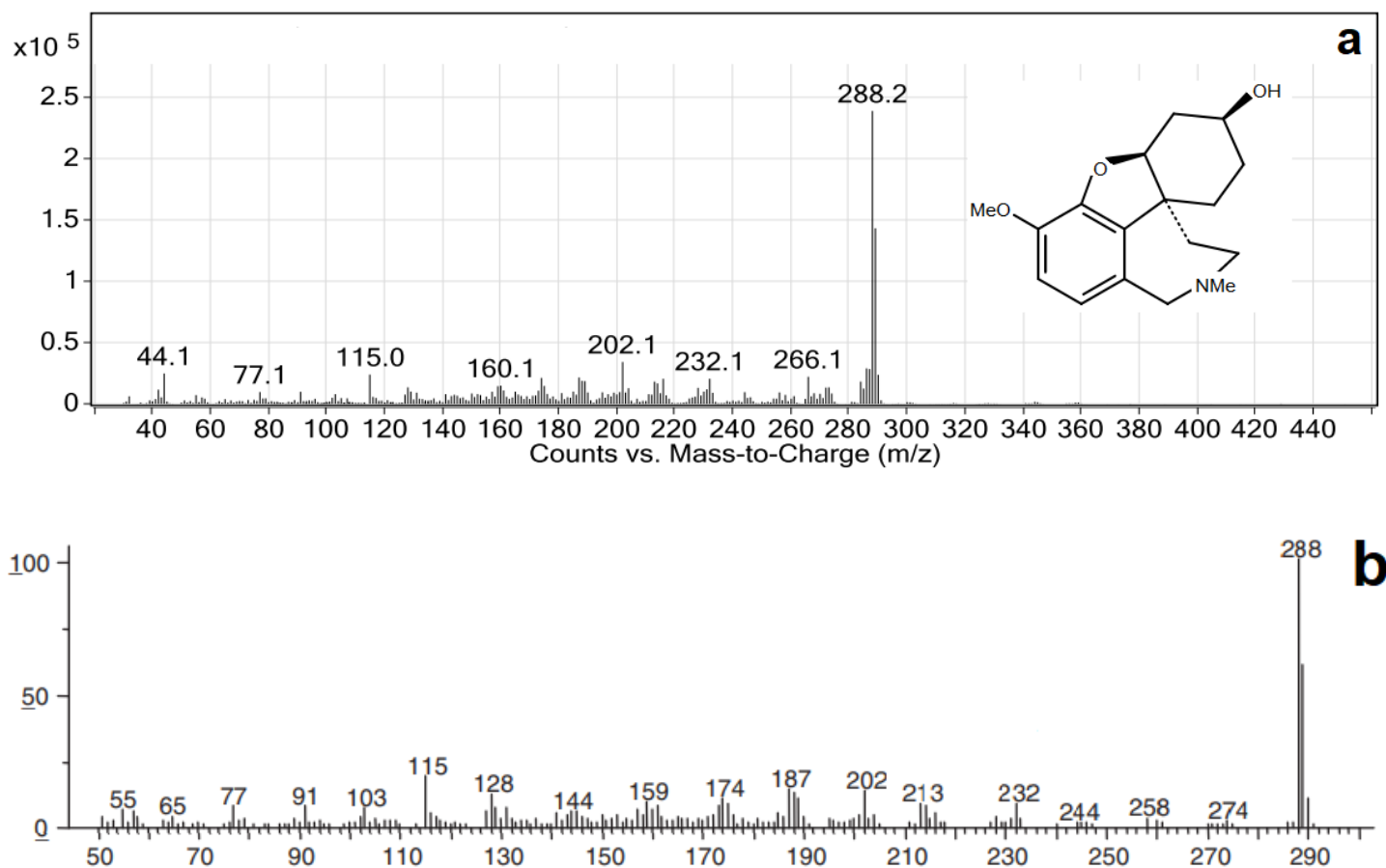


Figura 54. Espectro de masas de licoramina. **a**) Experimental de la FO2 de semillas (TR=15.83), patrón de fragmentación (m/z): 289 M⁺ (62.5), 288.2 (100%), 232.1 (10%), 202.2 (15%), 115.0 (12%). **b**) Tomado de Berkov *et al.*, 2012, modificado Soriano-García (2019).

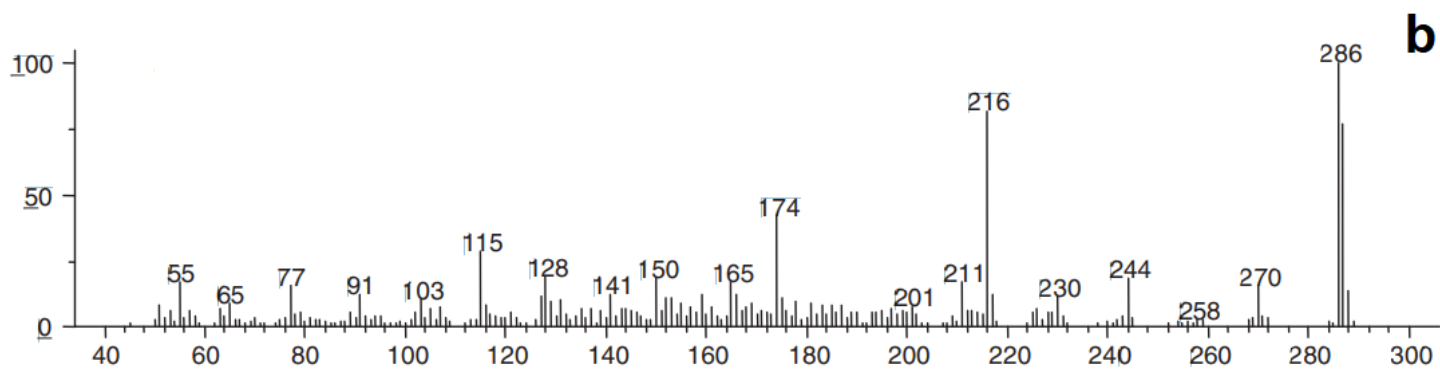
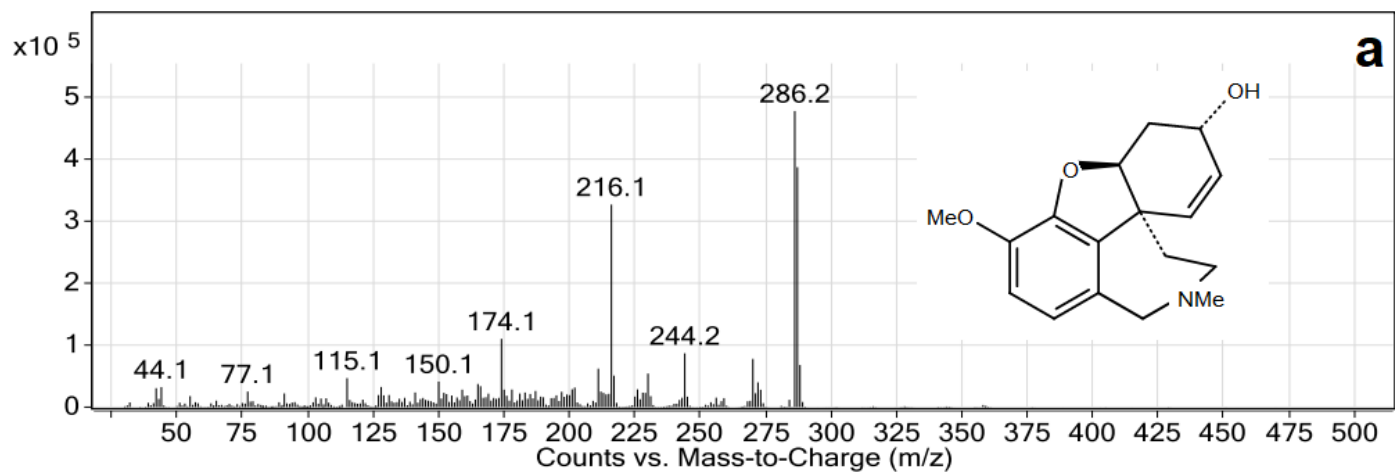


Figura 57. Espectro de masas de Epigalantamina. **a)** Experimental de la FO2 de hojas (TR=16.33), patrón de fragmentación (m/z): 287 M⁺ (85), 286.2 (100%), 244.2 (20%), 216.1 (70%), 174.1 (25%). **b)** Tomado de Berkov *et al.*, (2012).

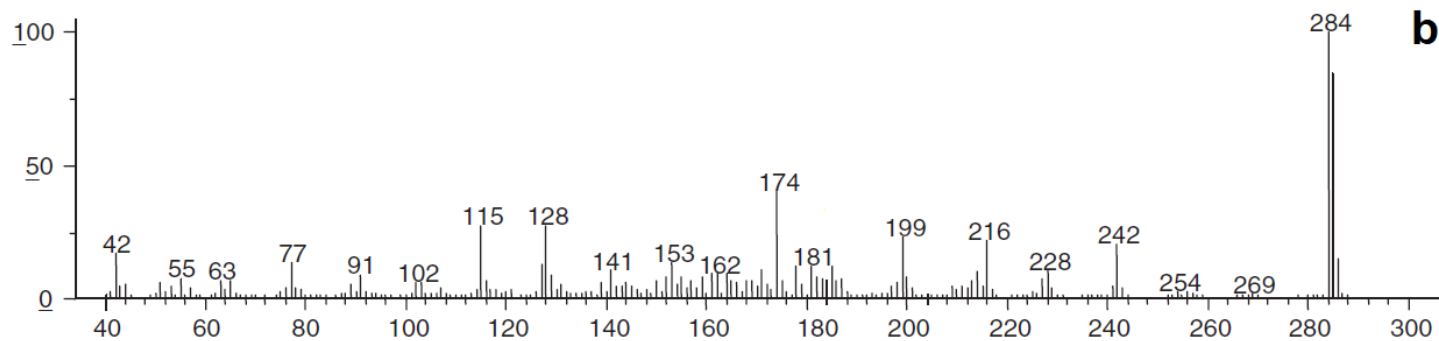
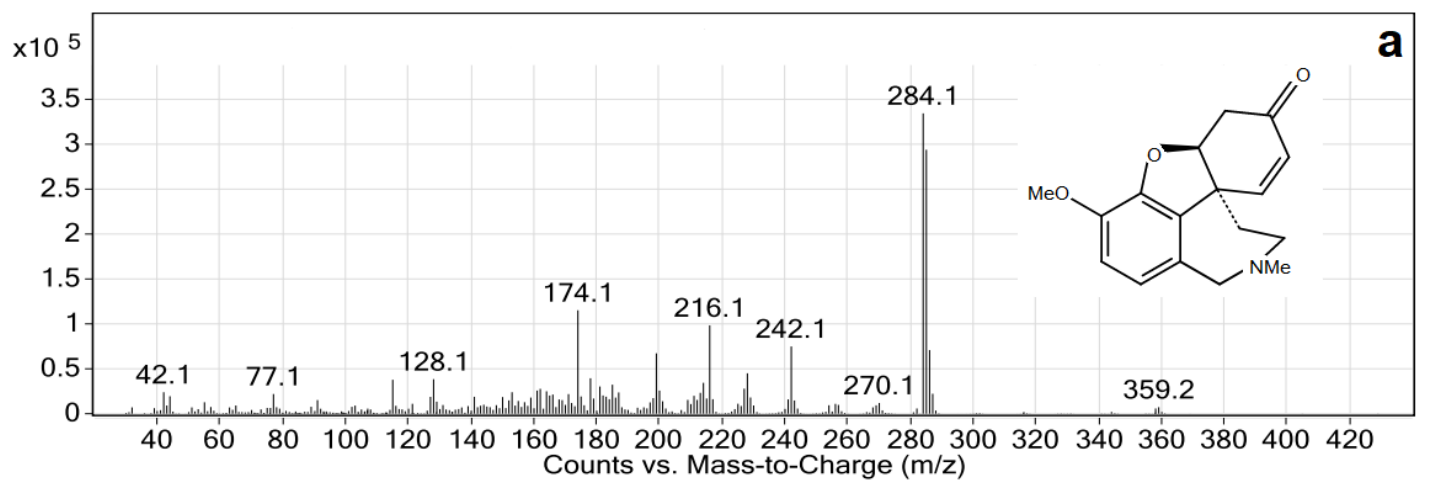


Figura 56. Espectro de masas de Narwedina. **a**) Experimental de la FO2 de bulbos (TR=16.69), patrón de fragmentación (m/z): 285 M+ (90%), 284.1 (100%), 242.1 (27%), 216.1 (30%), 174.1 (35%). **b**) Tomado de Berkov *et al.*, 2012, modificado Soriano-García (2019).

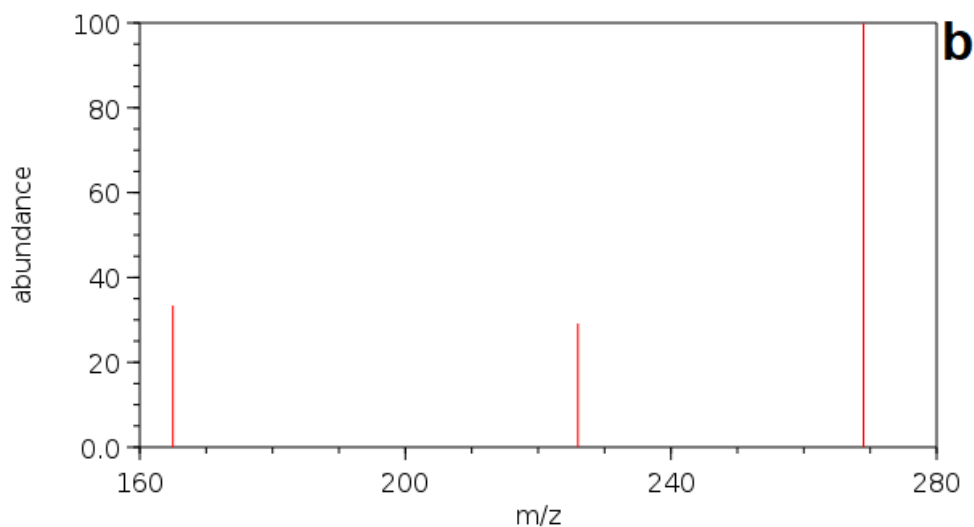
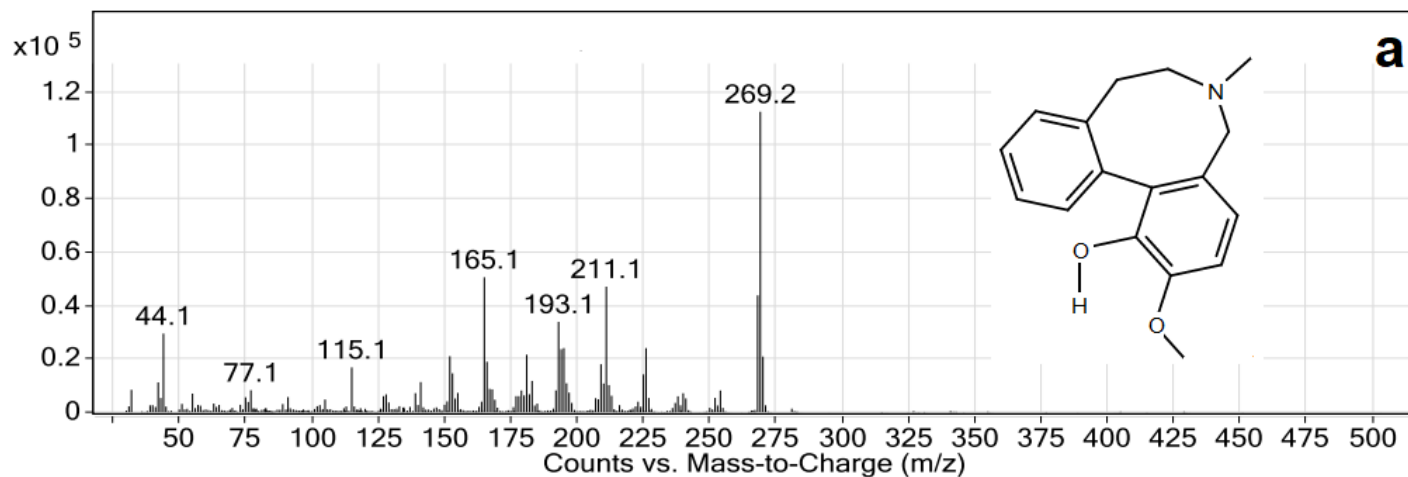


Figura 57. Espectro de masas de la metil-apogalantamina. **a)** Experimental de la FO2 de túnica (TR=13.2), con patrón de fragmentación (m/z): 269.2 M^+ (100%), 211.1 (43%), 165.1 (48%). **b)** Tomado de Base de Datos PubChem (2019) U.S. Secretary of Commerce 2014. Los picos más importantes por su abundancia son: 269, 226 y 165.

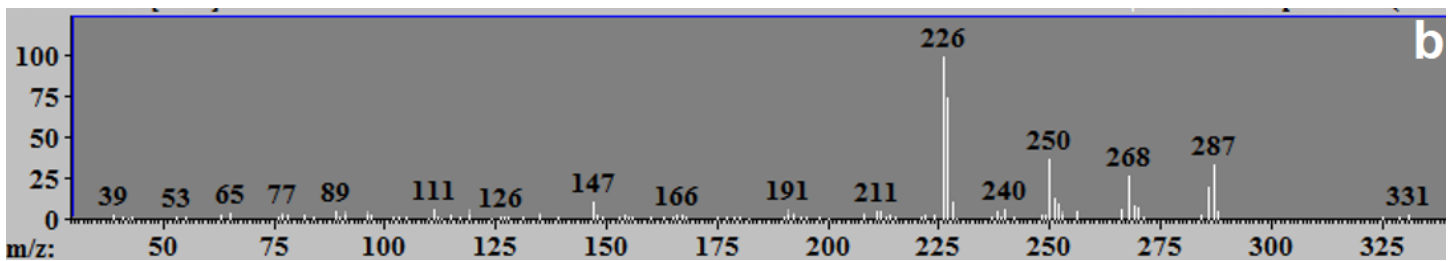
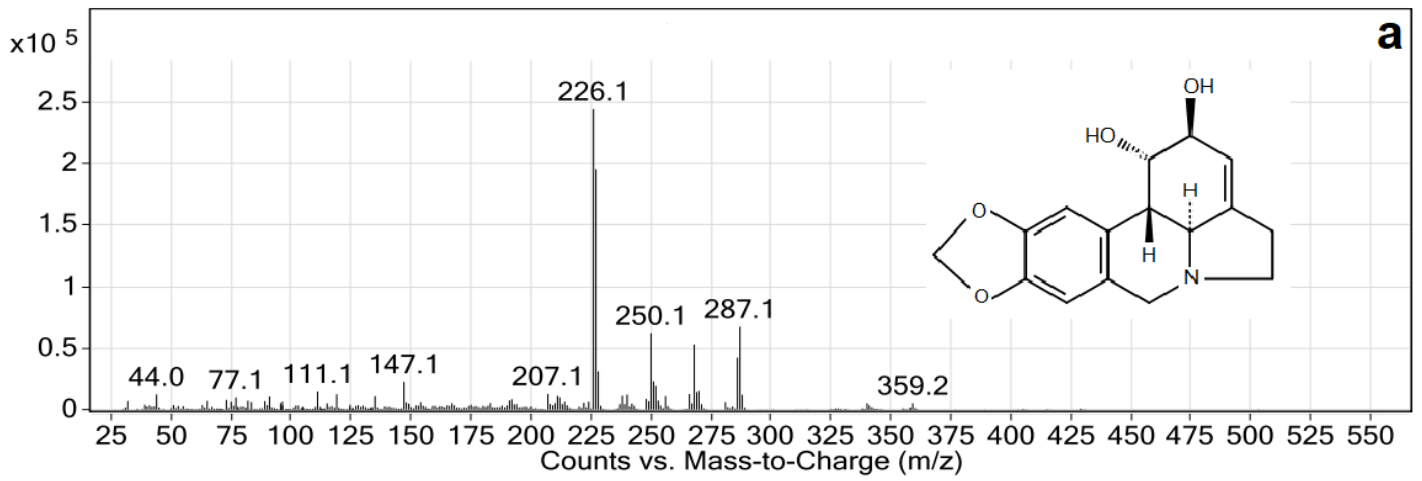


Figura 58. Espectro de masas de Licorina. **a**) Experimental de la FO2 de raíces (TR=20.32), patrón de fragmentación (m/z): 287.1 M⁺ (28%), 250.1 (27%), 226.1 (100%). **b**) Base de datos NIST.

Todas las FO2 de *H. concolor* presentaron galantamina, narwedina y clidantina, excepto ésta última, que no se identificó en bulbos ni semillas (Cuadro 3). Se encontró como componente mayoritario galantamina en todos los órganos de la planta. El segundo compuesto de mayor abundancia fue la epigalantamina en bulbos, túnica, hojas y raíces, mientras que en el escapo floral fresco y seco fue la clidantina y en semillas la licorina (Cuadro 3). Cabe resaltar que solamente las raíces y semillas contuvieron licorina y únicamente en semillas se identificó la licoramina (Cuadro 3).

El compuesto no identificado m/z 358.2/359 (TR=16.2) (Anexo 15) estuvo presente en todas las muestras analizadas, excepto en bulbos y semillas, con un porcentaje relativo inferior al 3.31%, salvo en el escapo floral fresco, con el 7.38 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Compuestos identificados mediante CG-EM en las FO2 de distintos órganos de *H. concolor*. Se indica el porcentaje relativo del compuesto identificado; en negritas se resalta el componente mayoritario, mientras que en paréntesis se indica el TR (min.).

Compuesto (m/z)	Muestra % (TR)						
	Bulbos	Catáfilas	Hojas	Raíces	Escapo fresco	Escapo seco	Semillas
Metil galactosido (1S,2S,3S,4R,5R)-, 4TMS derivado (204.1/219)	2.62 (8.97)						
Metil esterato (74.1/298)	2.19 (11.9)						
Metil-apogalantamina* (269.2/269.2)		2.39 (13.2)			3.2 (13.2)		
m/z (269.2/269.2)						2.38 (14.44)	
m/z 32/340.9	1.90 (15.16)						
Galantamina (286/287)	45.15 (15.58)	70.70 (15.61)	43.62 (15.56)	60.03 (15.66)	72.66 (15.56)	63.15 (15.65)	69.01 (15.63)
Clidantina (286/287)		3.81 (15.7)	6.39 (15.69)	6.34 (15.71)	10.12 (15.69)	17.61 (15.78)	
m/z 287.2/287.2							3.07 (15.72)
Dihidrocodeína (300.2/301)	2.27 (15.78)						
2-Naftalencarboxamida, N-(1,3-difenil-3-oxo-1-propenil)- (300.2/301)		1.37 (15.78)					
m/z 284.2/301					1.89 (15.81)		
6H-Dibenzo[b,d]piran-6-ona, 7,9-dihidroxi-3-metoxi-1-metil- (273.2/301)						4.45 (15.83)	
Licoramina (288.2/289)							5.50 (15.83)
m/z 344.2/345 (Anexo 14)			0.90 (15.94)	0.97 (15.94)	0.98 (15.94)	2.09 (15.96)	
3,4,4a,5,6,7-Hexahidro-9,10-dimetoxi-2-oxo-2H-dibenzo(a,c)cicloheptano (Anexo 9)					4.07 (16.07)		
m/z 358.2/359		1.63 (16.2)	2.8 (16.2)	2.11 (16.2)	3.31 (16.2)	7.38 (16.2)	
Epigalantamina (286.2/287)	33.26 (16.33)	15.84 (16.31)	40.23 (16.33)	15.86 (16.31)	1.56 (16.3)		
m/z 344.2/345. (Anexo 16)			0.67 (16.53)				
Narwedina** (284.1/285)	10.54 (16.69)	4.23 (16.68)	3.58 (16.68)	7.34 (16.68)	2.17 (16.68)	2.92 (16.68)	1.52 (16.69)
m/z 216.1/359.2	2.03 (16.8)		1.75 (16.78)				
Licorina (226.1/ 287.1)				7.31 (20.3)			20.87 (20.32)

*dibenzo[c,E]azocin-1-ol, 2-metoxi-6-metil-5,6,7,8-tetrahidro-

** (4aS,8aS)-3-Metoxi-11-metil-9,10,11,12-tetrahidro-4aH-benzo[2,3]benzofuro[4,3-cd]azepin-6(5H)-ona

A partir del análisis de las por CG-EM de los distintos órganos de *H. concolor* se observó la diferente composición química y contenido de alcaloides de tipo Amaryllidaceae (principalmente esqueletos tipo licorina y galantamina), así como su porcentaje relativo (Cuadro 3).

La galantamina es un alcaloide que puede inhibir la acetilcolinesterasa al unirse a su sitio activo, por lo que actúa en el sistema nervioso central y es efectivo para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer (Bastida *et al.*, 2011). Este alcaloide fue el compuesto con porcentaje relativo mayor en todos los órganos de *H. concolor* analizados, destacando el escapo floral fresco y la túnica, con 72.66 y 70.70 %, respectivamente (Cuadro 3).

La clidantina ha sido reportada en la inhibición *in vitro* de la acetilcolinesterasa en el modelo de la anguila eléctrica, sin embargo resultó ser cinco veces menos potente que la galantamina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011).

La metil-apogalantamina fue el alcaloide que se encontró únicamente en la túnica y el escapo seco a muy bajas concentraciones (2.39 y 3.2%, respectivamente) (Cuadro 3), este alcaloide ha sido reportado con efecto vasodilatador (Pogorelyĭ y Gaevyĭ, 1987; Pogorelyĭ, 1981).

La licorina, se encontró exclusivamente en las raíces y semillas, siendo en estas últimas el segundo compuesto mayoritario (20.87%) (Cuadro 3). Se ha reportado la actividad antiinflamatoria (Çitoğlu *et al.*, 1998), antitumoral (Lamoral-Theys *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2004, Roy *et al.*, 2018), antifúngica en la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariontes (Jimenez *et al.*, 1976) y antioxidante (Brandt *et al.*, 2008). Además de presentar potente actividad citotóxica (Lin *et al.*, 1995). No se encontró alguna actividad biológica reportada para la epigalantamina.

Resulta interesante contrastar la composición química de los bulbos y túnica de *H. concolor*, por una parte, la túnica presentó alcaloides que el bulbo no contiene, como metil-apogalantamina, clidantina, así como compuestos no identificados; por otra parte, alcaloides como la epigalantamina y narwedina estuvieron presentes en un menor porcentaje relativo en la túnica. En contraste, la galantamina tuvo un porcentaje mayor (Cuadro 3). Anatómicamente, *H. concolor* presenta bulbos tunicados, los cuales

presentan catáfilas exteriores secas y membranosas (llamadas túnicas) por la presencia de hojas sin clorofila, encargadas de brindar protección a las catáfilas internas carnosas, encargadas de almacenar los nutrientes de la planta (González *et al.*, 2007). Ambas estructuras poseen la misma composición celular, por lo que se infiere que los procesos de senescencia podrían estar modificando la composición química del tejido. Lo mismo que ocurrió en la composición química del escapo floral fresco y seco (Cuadro 3).

Con base en el perfil fitoquímico de *H. concolor* se reafirma que las plantas producen una mezcla compleja de alcaloides, el contenido de los mismos puede ser muy desigual según los órganos, a veces puede estar dominado por un compuesto mayoritario (como la galantamina) o bien, algunos pueden carecer de ellos; fenómeno que se ha descrito en diversas especies vegetales (Bruneton, 2001).

9 Conclusiones

Las semillas recién colectadas de *H. concolor* presentaron elevados porcentajes de viabilidad y germinación, son semillas ortodoxas, permeables y fotoblásticas indiferentes.

El mejor almacenamiento para las semillas de *H. concolor* fue a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2.7$) al mantener el contenido de humedad más bajo y los más altos porcentajes de germinación (96%) hasta por 9 meses.

Considerando el porcentaje de germinación superior al 92%, los tratamientos de acondicionamiento empleados no mostraron diferencias significativas sugiriendo que las semillas en el ambiente donde se desarrollaron tuvieron un acondicionamiento natural. Respecto a la velocidad de germinación y la sobrevivencia de las plantas, tanto el hidropriming a 22°C como el osmopriming a -6 atm, fueron los mejores tratamientos de acondicionamiento, destacando el primero por la facilidad y bajo costo.

Se observó mayor formación de nuevos bulbillos a partir de los bulbos más grandes. El desarrollo de nuevos bulbos estuvo determinado por el daño a la yema apical. A mayor cantidad de bulbos producidos, menor tamaño y formación de órganos.

Mediante la CG-EM se determinó que el componente mayoritario en todos los extractos de *H. concolor* fue la galantamina. También se detectó la presencia de alcaloides como: clidantina, narwedina, metilapogalantamina, licorina, licoramina, así como otros compuestos no identificados, observando un contenido alcaloideo desigual de acuerdo a la estructura evaluada.

10 Perspectivas

Evaluación fitoquímica y análisis cualitativo del material vegetal de *H. concolor* propagado sexual y asexualmente, con especial interés en la producción de galantamina.

Realizar la identificación del compuesto no identificado m/z 358.2/359 debido a la presencia de éste en la mayoría de los órganos analizados.

Dar seguimiento a la tasa de crecimiento de los individuos propagados (sexual y asexualmente) y hacer una estimación de la edad de los ejemplares maduros sexualmente y el tiempo que tardan éstos en llegar a la etapa reproductiva.

Conocer el tiempo de almacenamiento que pueden mantener la calidad las semillas de *H. concolor*, con interés en la formación de un banco de semillas.

11 Referencias

- Abbott L. y Evans A. (2006). *Planta*. Santillana Ediciones Generales. México. 512 pp.
- Abreu, G. y Cuéllar, A. (2008). Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(3), 14 pp.
- Ago, Y., Koda, K., Takuma, K., y Matsuda, T. (2011). Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. *Journal of pharmacological sciences*, 116(1), 6-17.
- Aguilar, A. y Camacho, J. (1985). Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. *Archivos de investigación médica. México, DF Suplemento*, 6, 13-14.
- Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jácquez, P. y López, M. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 253 pp.
- Alpi, A. y Tognoni, F. (1991). *Cultivo en Invernadero*. Mundi-Prensa Libros. España. 347 pp.
- Alpizar-Quesada, C. y Morales-Alpíza, C. (2003). La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Médica Costarricense*, 45(2), 50-56.
- Alvarado, A. y Bradford, K. (1988). Priming and storage of tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) seeds. II. Influence of a second priming treatment after storage on germination and field emergence. *Seed Science and Technology*, 16, 613-623.
- Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C., Corrales-Lerma, R., Avendaño-Arrazate, C., Rubio-Arias, H., y Villarreal-Guerrero, F. (2018). Caracterización estomática, concentración de clorofila y su relación con producción de biomasa en *Bouteloua curtipendula*. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 251-261.
- Álvarez, M. A. (2014). *Plant Biotechnology for Health*. Springer International. Argentina. 161 pp.
- Alzheimer's Disease International. (2015). The global impact of Dementia, an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London. Recuperado de: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf> [30 de mayo de 2017].
- Alzheimer's Disease Medications. (2018). National Institute on Aging (NIH). NIH publication, 3431, 1-3. Recuperado de: <https://order.nia.nih.gov/sites/default/files/2018-03/alzheimers-disease-medications-fact-sheet.pdf> [13 de noviembre de 2018].

- Amaral-Lopes, A. C., y Barbosa, T. (2015). *Habranthus* (Amaryllidaceae) of Brasil. *Rodriguésia*, 66(1), 203-220.
- Andrade-Rodríguez, M., Guillén-Sánchez, D., Villegas-Torres, O. G., Ayala-Hernández, J. J., López-Martínez, V., y Vargas-Araujo, J. (2015). Bulb cutting methods to propagate *Hippeastrum hybridum* Hort. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(1), 57-69.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Ediciones McGraw-Hill/Interamericana. España. 651 pp.
- Báez-Pérez, A., González-Molina, L., Solís Moya, E., Bautista-Cruz, A., y Bernal-Alarcón, M. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 523-537.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B. y Sánchez, R. (2001). Fotomorfogénesis en Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. España. 568 pp.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N. B., Andradre, J. P. D., Martínez, V., Codina, C. y Viladomat Meya, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2011, Capítulo 3, p. 65-100. Editor: Diego Muñoz-Torrero.
- Bastida, J., Lavilla, R., y Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology*, 63, 87-179.
- Bautista, Ó. M. (2014). Síntesis y evaluación farmacológica de nuevas moléculas multipotentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Bazzigalupi, O., Font, A. E., Llera, A., y Aquilano, C. G. (2013). Efecto de tiempos de imbibición y soluciones aplicadas en el priming sobre el comportamiento germinativo de semillas de coriandro. *Horticultura Argentina*, 32(79), 20-24.
- Bentham, G., y Hooker, J. D. (1883). *Genera plantarum*. Reeve, London. vol. 3, part 2. Recuperado de: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/14690#page/3/mode/1up> [15 de febrero de 2019].
- Berjak, P., y Pammenter, N. (2010). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. Manual de semillas de árboles tropicales. Vozzo, J. (ed.). *Departamento de Agricultura de los Estado Unidos*. 143-155 pp.

- Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Suárez, S., Ravelo, A., y Bastida, J. (2012). GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(8), 1065-1073.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Bewley, J. D., Bradford, K., y Hilhorst, H. (2013). Seeds: physiology of development, germination and dormancy. (2da Ed). Springer Science. E.U.A. 392 pp.
- Black, M., y Bewley, J. D. (Eds.). (2000). Seed technology and its biological basis. Sheffield Academic Press, Inglaterra. 428 pp.
- Bowers, J. (2000). Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a betweenyear seed bank?. *Journal of Arid Environment*, 45,197–205.
- Brandt, R., Balvedi, L., Henriques, A., Zuanazzi, J., y Dutilh, J. (2008). Investigación do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, 31 (8), 2042-2046.
- BrightFocus® Foundation. (2018). Tratamientos de la enfermedad de Alzheimer. Alzheimer's Disease Research Recuperado de <https://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/tratamientos-de-la-enfermedad-de-alzheimer> [08 febrero 2019].
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales (3ª Ed). Technique et Documentation-Lavoisier. España. 1100 pp.
- Bunt, A. (1988). Media and mixes for container grown plants. Boston: Unwin Hyman. 309 pp.
- Cabral, E. (2000). Biotaxonomía de Espermatofitas. Diversidad Vegetal. FACEDA (UNNE) Argentina, 279 pp.
- Calderón, A. (2005). Sustratos Agrícolas. Proyecto Fondef. Universidad de Chile. 4 pp.
- Calderón, G. y Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México (2da Ed.). Instituto de Ecología, A.C. México. 1258 pp.
- Cásseres, E. (1980). Producción de Hortalizas (3ª Ed). Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. 387 pp.

Castillo-Agüero., Montes, C., Romero-Romero, Martínez, O., Guadarrama-Chávez., Sánchez-Gallén, I., y Núñez, C. (2004). Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la reserva ecológica del pedregal. México DF. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 74, 51-75.

Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y., Romero-Romero, M. A., Guadarrama-Chávez, P., Núñez-Castillo, O., Sánchez-Gallén, I., y Meave, J. A. (2007). La reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos y ecológicos. *Coordinación de la Investigación Científica. Universidad Nacional Autónoma de México*, México, DF. 294 pp.

Centeno, L. (2014). Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus* aff. *concolor*. Tesis (Maestría en Ciencias biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Chase, M. W., Reveal, J. L., y Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132-136.

Çitoğlu, G., Tanker, M., y Gümüşel, B. (1998). Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(3), 205-206.

Come, D. (1970). Les obstacles a la germination. Masson. Et cie editeurs, Paris. 162 pp.

Copeland, L. y McDonald, M. (1995). Principles of seed Science and Technology. (3ª Ed.). Chapman y Hall. New York. 409 pp.

Cueva, S. (2012). Efecto del ácido indol-3-butírico (AIB) para incrementar la producción de raíces comerciales en yuca (*Manihot esculenta*) 'Valencia'. Proyecto Especial Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 20 pp.

Cummings, J. (2004). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 351, 57-67

Damián-Domínguez. (2010). Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus* aff. *concolor* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, D.F. Tesis. (Bióloga) Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 75 pp.

- Dutilh, J. H. A., y Oliveira, R. S. (2005). Amaryllidaceae. Wanderley, MGL; Shepherd, GJ; Melhem, TS; Martins (eds.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Rima, FAPESP, São Paulo, 4, 244–256.
- Echeverría, M. L., y Alonso, S. I. (2010). Germinación y crecimiento inicial de *Habranthus gracilifolius* y *Rhodophiala bifida*, amarilidáceas nativas con potencial ornamental. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 42(1), 23-37.
- Flagg, R. O., Smith, G. L., y García-Mendoza, A. J. (2018). *Zephyranthes pseudoconcolor* (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae), a New Species from Mexico, and Clarification of *Z. concolor*. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 26(3), 290-298.
- Flores, J., González-Salvatierra, C., y Jurado, E. (2016). Effect of light on seed germination and seedling shape of succulent species from Mexico. *Journal of Plant Ecology*, 9(2), 174-179.
- Flores, L. (2010). Alzheimer, un mal ignorado. El Universal. México. Recuperado de: <http://archivo.eluniversal.com.mx/nacion/182759.html> [20 de mayo de 2017].
- Fontañña, M., Sau, F., y López, J. (1993). Comportamiento hídrico de castaños micropropagados durante la aclimatación y cultivo en vivero. *Congreso Forestal Español*, 2, 165-170.
- Fuentes, P. (2003). Enfermedad de Alzheimer: una nota histórica. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 41, 9-12.
- Furque, V., Killian, S., Morales, N., y Esnarriaga, N. (2015). Efecto del hidroacondicionamiento sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Avances en la producción vegetal y animal del NOA 2009-2011*, 34-39 pp.
- García, N., Folk, R. A., Meerow, A. W., Chamala, S., Gitzendanner, M. A., de Oliveira, R. S., ... y Soltis, P. S. (2017). Deep reticulation and incomplete lineage sorting obscure the diploid phylogeny of rain-lilies and allies (Amaryllidaceae tribe Hippeastreae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 111, 231-247.
- Gardner, F., Pearce., y Mitchell, R. (1985). *Physiology of Crop Plants*. Iowa State Univ. E.U.A. 327 pp.
- Ghodrat, V., y Rousta, M. J. (2012). Effect of priming with gibberellic acid (GA3) on germination and growth of corn (*Zea mays* L.) under saline conditions. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(13), 882-885.

- Giménez, S., Sampaio, V, N, Retamal, P, N, Duran, A, J, M., (1993). Acondicionamiento osmótico de semillas, aplicación al cultivo de pimientos. *Revista Agropecuaria*, 62, 124-127.
- Gold, K., León-Lobos, P., y Way, M. (2004). Manual de recolección de semillas de plantas silvestres. *Editorial Altamirano. La Serena-Chile*. 372 pp.
- González, A., Cedillo, E. y Díaz, L. (2007). Morfología y anatomía de las plantas con flores. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 328 pp.
- Gordon, A.G. (1991). Tree and shrub seed handbook. The International Seed Testing Association, Zurich, Suiza. 109 pp.
- Graviotto, R. (s.f.) Humedad de la semilla como atributo de calidad. Argentina. PRECOP. Hacia la industrialización del campo. Recuperado de <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/calidad/HumedadSemillaComoAtributoCalidad.asp> [25 de noviembre de 2018].
- Hanks, G. R. (1993). *Narcissus*. The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier, Amsterdam, 463-558.
- Hartmann, H. y Kester, D. (1987). Propagación de plantas, principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V. México. 814 pp.
- Hernández, A. y Carballo, A. (2010). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. SAGARPA. México. 8 pp.
- Hernández. R. y Gally, M. (1989). Plantas medicinales: uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América Latina. Árbol editorial, S. A. de C. V. Colombia. 354 pp.
- Heydecker, W., Higgins, J. y Gulliver, R. (1973). Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*, 246, 42-44.
- Hong, T. y Ellis, R.H. (1995). Interspecific variation in seed storage behavior within two genera: *Coffea* and *Citrus*. *Seed Science and Technology*, 23,165-181
- Howland, R. H. (2010). Drug therapies for cognitive impairment and dementia. *Journal of psychosocial nursing and mental health services*, 48(4), 11-14.

- Irigoyen, J. I., y Vela, C. (2005). *Guía técnica de semilleros y viveros frutales*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de Frutas de El Salvador. El Salvador. 36 pp.
- Jiisha, K.C., Vijayakumari, K., Puthur, J.T. (2013). Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *Acta Physiologica Plantarum*, 35, 1381-1396.
- Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G., y Vazquez, D. (1976). Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 425(3), 342-348.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Squeo, F, A., y Cardemil, L. (eds.). Ediciones Universidad de La Serena, 28 pp.
- Jurado, E. y Flores, J. (2005). Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? *Journal Vegetation Science*, 16, 559-64.
- Karlovsky, P. (2008). Secondary metabolites in soil ecology. Springer. Alemania. 293 pp.
- Lamoral-Theys, D., Decaestecker, C., Mathieu, V., Dubois, J., Kornienko, A., Kiss, R., ... y Pottier, L. (2010). Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(1), 41-50.
- Lara, F. y Márquez, C. (1996). Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica. UNAM. México. 137 pp.
- Lawson, T., y Blatt, M. (2014). Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology*, 164(4), 1556-1570.
- Lin, L. Z., Hu, S. F., Chai, H. B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., y Ruangrunsi, N. (1995). Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry*, 40(4), 1295-1298.
- Liu, J., Hu, W. X., He, L. F., Ye, M., y Li, Y. (2004). Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS letters*, 578(3), 245-250.
- Lizama, I. (2017). Quimiotaxonomía de Amaryllidaceae chilenas: Alcaloides como marcadores taxonómicos (Tesis Doctorado) Universidad de Concepción. Chile.

- López, S., Bastida, J., Viladomat, F., y Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, 71(21), 2521-2529.
- López-Ferrari, A. y Espejo-Serna, A. (2002). Flora de Veracruz: Amaryllidaceae Fascículo 128. Instituto de Ecología A.C. México. 2 pp.
- Ma, H. Y., Zhao, D. D., Ning, Q. R., Wei, J. P., Li, Y., Wang, M. M., ... y Liang, Z. W. (2018). A Multi-year beneficial effect of seed priming with gibberellic acid-3 (GA3) en Plant Growth and Production in a Perennial Grass, *Leymus chinensis*. *Scientific reports*, 8(1), 13214.
- Marco-Contelles, J., do Carmo Carreiras, M., Rodríguez, C., Villarroya, M., y Garcia, A. G. (2006). Synthesis and pharmacology of galantamine. *Chemical reviews*, 106(1), 116-133.
- Martínez R., Rojo G., García, C. y Ramírez, B. (2009). Tecnologías de Granos y Semillas. Libros técnicos: Serie Agricultura. Universidad Autónoma Indígena de México. 278 pp.
- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. Fundamentos de fisiología vegetal. 22 pp.
- Méndez, J. (2014). Osmoacondicionamiento de semillas de *Beaucarnea gracilis* Lem. como tratamiento pregerminativo. (Tesis Maestría) Universidad Autónoma Metropolitana. México
- Miranda, N. y Belmar, N. (1977). Déficit hídrico y frecuencia de riego en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica*, 37(3), 111-117.
- Moreno, E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas (1ª Ed.). UNAM. México D.F. 383 pp.
- Moreno, E., Vázquez M., y Facio, F. (2000). La temperatura en relación con la longevidad de semillas de maíz almacenadas con baja humedad. *Agrociencia*, 34(2), 175-180.
- Nawaz, J., Hussain, M., Jabbar, A., Nadeem, G. A., Sajid, M., Subtain, M. U., y Shabbir, I. (2013). Seed Priming a technique. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(20), 1373.
- Nelson, P.V. (1978). Greenhouse operation and management. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, Inc. 598 pp.

- Noguera, S., Zaragoza, J. y Feresin, G. (2017). Estudio para la propagación (agámica y sexual) de *Rhodophiala mendocina* (Phil.) Ravenna. *Horticultura Argentina*, 36(91), 18.
- OMS, 2016. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/> [27 de noviembre de 2016].
- Márquez, J. *et al.* (2013). *Biología de Angiospermas*. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 632 pp.
- Osuna, L., Tapia, M. y Aguilar, A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Universitat de Barcelona. 173 pp.
- Padilla-Sánchez, A., Andrade-Rodríguez, M., Alia-Tejacal, I., Villegas-Torres, O. y Guillén-Sánchez, D. (2016). Propagación vegetativa y sexual de mayito (*Zephyranthes fosteri* Traub y *Zephyranthes lindleyana* Herb.) (Amaryllidaceae). *Acta agrícola y Pecuaria*, 2(2), 34-42.
- Paniagua, P.G., A.C. Hernández, M.F. Rico, P.F. Domínguez, O.E. Martínez y G.C. Martínez. (2015). Efecto de la luz de alta intensidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de Brócoli (*Brassia olearacea* L.). *Polibotánica*, 40, 199-212.
- Parera, A. C.; Cantliffe, D. J. (1994). Presowing seed priming. *Horticultural Review*, 16, 109-141.
- Sauer, D. (1992). *Storage of Cereal Grains and Their Products*. American Association Cereal Chemists. USA. 615 pp.
- Peretti, A. (1994). *Manual para Análisis de semillas*. Ed. Hemisferio Sur S. A. Argentina. 281 pp.
- Pérez, F. (2017). *Fisiología Vegetal, Parte IV*. Universidad Nacional de Ucayali, 382 pp.
- Pérez, F., y Pita, J. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Universidad Politécnica de Madrid. España. 16 pp.
- Pill, W. G., y Necker, A. D. (2001). The effects of seed treatments on germination and establishment of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Seed science and technology*, 29(1), 65-72.
- Pogorelyí, V. E. (1981). Effect of pyroxan and methylapogalanthamine on cerebral circulation and the brain's oxygen regime. *Farmakologija i toksikologija*, 44(2), 167-170.

Pogorelyĭ, V. E., y Gaevyĭ, M. D. (1978). Effect of methylapogalanthamine on the tone of cerebral, extracranial and peripheral vessels. *Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 86(10), 438-441.

PubChem. (2019). Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylapogalanthamine#section=GC-MS> [13 de febrero de 2019].

Rainey, K. y Griffiths, P. (2005). Differential response of common bean genotypes to high temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(1), 18-23.

Reséndiz. (2010). Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Recuperado de: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/alzheimer.html> [27 de noviembre de 2016].

Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C., Arseneau, S., Clotet-Codina, I., Esté, J., Codina, C., Viladomat, F. y Bastida, J. (2011). Acetylcholinesterase-Inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16, 9520-9533.

Roberts, E. H. (1972). *Viability of Seeds*. Syracuse Univ. Press. USA. 14-58 pp.

Rojas, S., García, J., y Alarcón, M. (2004). Propagación asexual de plantas. *CORPOICA-PRONATTA*. 55 pp.

Rojo, A. y Rodríguez, J. (2002). *La flora del Pedregal de San Ángel*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México. 84 pp.

Rosselló, F. J., Marinangeli, P. A., Rodrigo, J. M., y Curvetto, N. R. (2006). Propagación vegetativa de *Habranthus tubispathus* Herb. (Amarilidaceae). En *Congreso Argentino de Floricultura. Jornadas Nacionales de Floricultura*. Buenos Aires. Argentina.

Roy, M., Liang, L., Xiao, X., Feng, P., Ye, M., y Liu, J. (2018). Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 107, 615-624.

Sáez, P., y Narciso, J. (1999). Utilización de sustratos en viveros. *Terra Latinoamericana*, 17(3), 231-235.

Sánchez, J. A., Calvo, E., Orta, R., y Muñoz, B. (1997). Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación para semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.). *Acta Botánica Mexicana*, 38, 13-20.

Sánchez, J. A., Orta, R., y Muñoz, B. C. (2001). Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agronomía Costarricense*, 25(1), 67-91.

Schiappacasse, F., Peñailillo, P. y Yáñez, P. (2002.) Propagación de Bulbosas Chilenas Ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Chile. 64 pp.

Shahzad, R., Khan, J., Gurmani, A. R., Waqas, M., Hamayun, M., Khan, A. L., ... y Lee, I. J. (2014). Seed priming with gibberellic acid (GA3) in sponge-gourd modulated high salinity stress. *Pakntunkhwa Journal Life Sciences*, 2, 75-86.

Shieh, W. C., y Carlson, J. A. (1994). Asymmetric transformation of either enantiomer of narwedine via total spontaneous resolution process, a concise solution to the synthesis of (-)-galanthamine. *The Journal of organic chemistry*, 59(18), 5463-5465.

Suárez, D., y Melgarejo, L. M. (2010). Biología y germinación de semillas. *Experimentos en Fisiología Vegetal. Universidad Nacional de Colombia*. Bogotá, Colombia. 277 pp.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). Plant physiology. Sinauer Associates Inc. Inglaterra. 782 pp.

Thanos, C. A., y Georgtrou, K. (1988). Osmoconditioning enhances cucumber and tomato seed germinability under adverse light conditions. *Israel Journal of Botany*, 37, 1-10.

Tortoriello, J. (2005) en: Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Osuna, L., Tapia, M. y Aguilar, A. Universitat de Barcelona. 173 pp.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden (2019). Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/50003193> [25 de marzo de 2019].

Vásquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, E. y Cervantes, V. (1997). La reproducción de plantas: semillas y meristemas. Fondo de Cultura Económica. México. 177 pp.

Vieira, E., y Castro, P. R. C. (2002). Ação de Stimulate no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). *Piracicaba: USP, Departamento de Ciências Biológicas*. 3 pp.

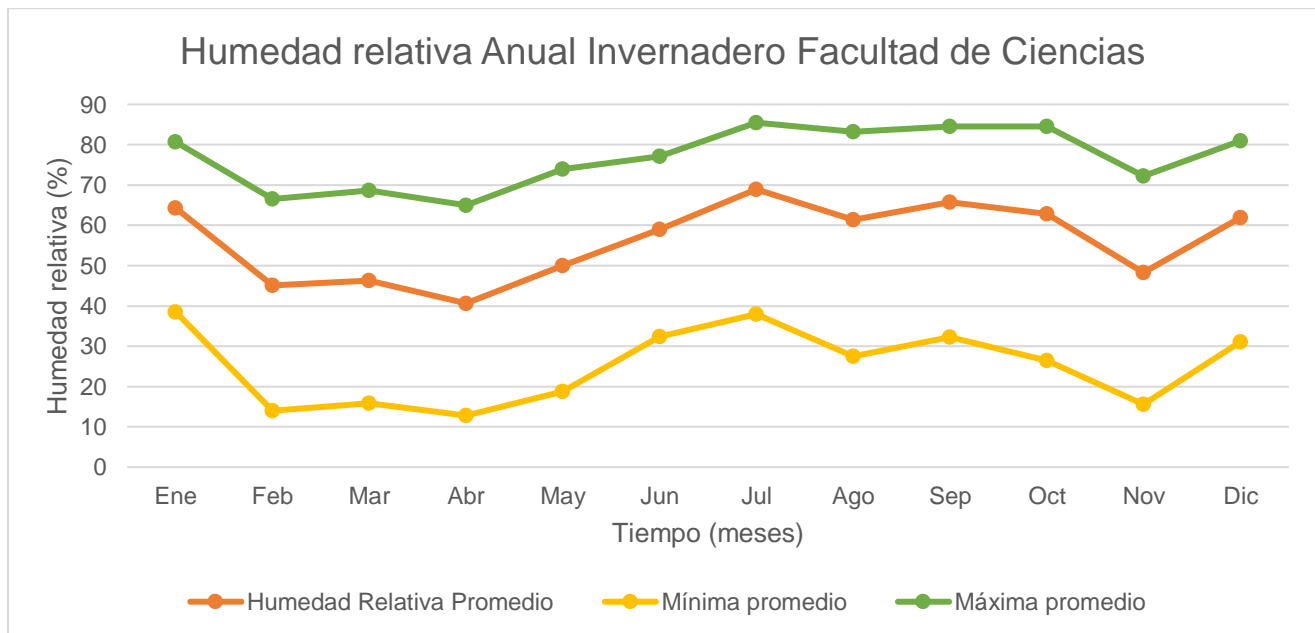
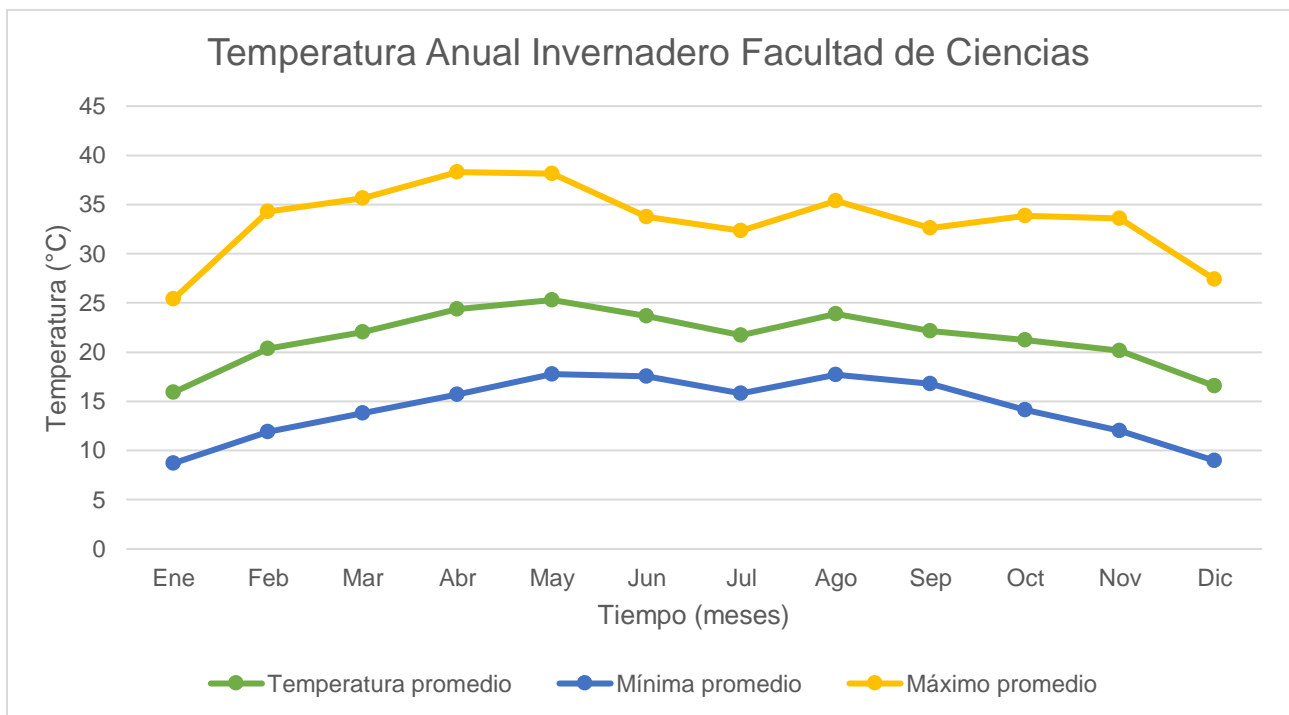
Villaseñor, J. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902.

Wagner, H. y Blatt, S. (1996). Plant drug analysis. A thin layer chromatography. Berlin. Springer-Verlag. 384 pp.

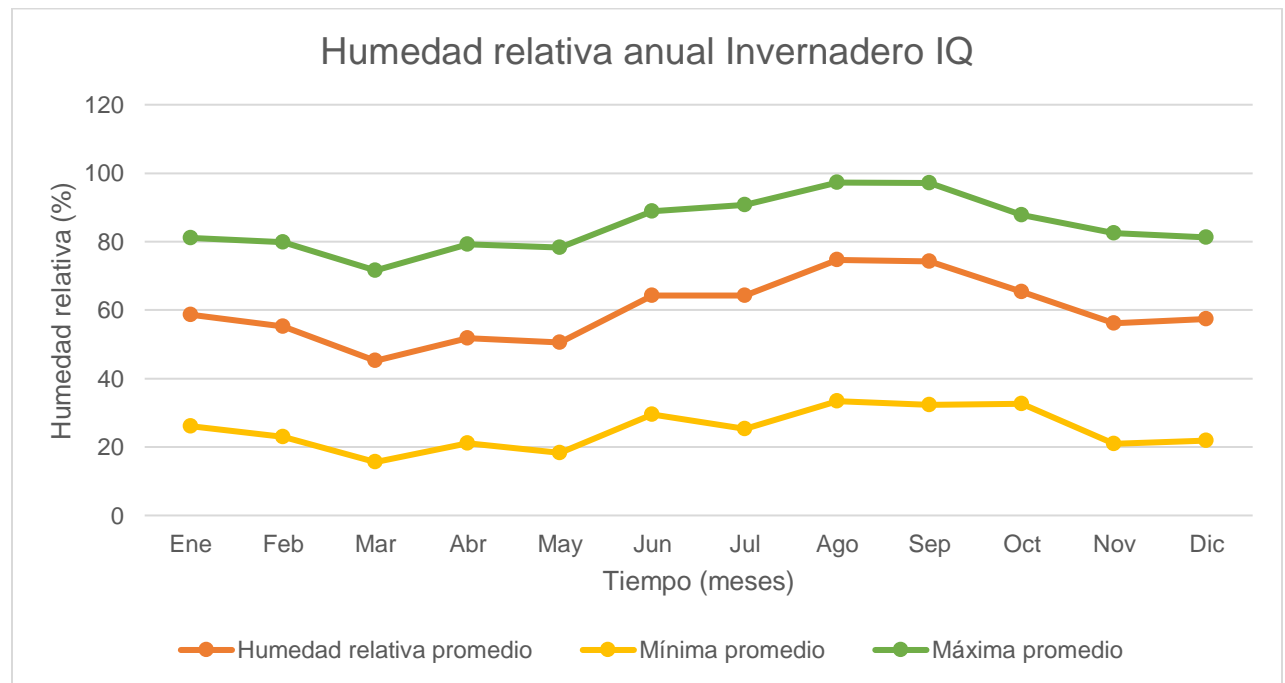
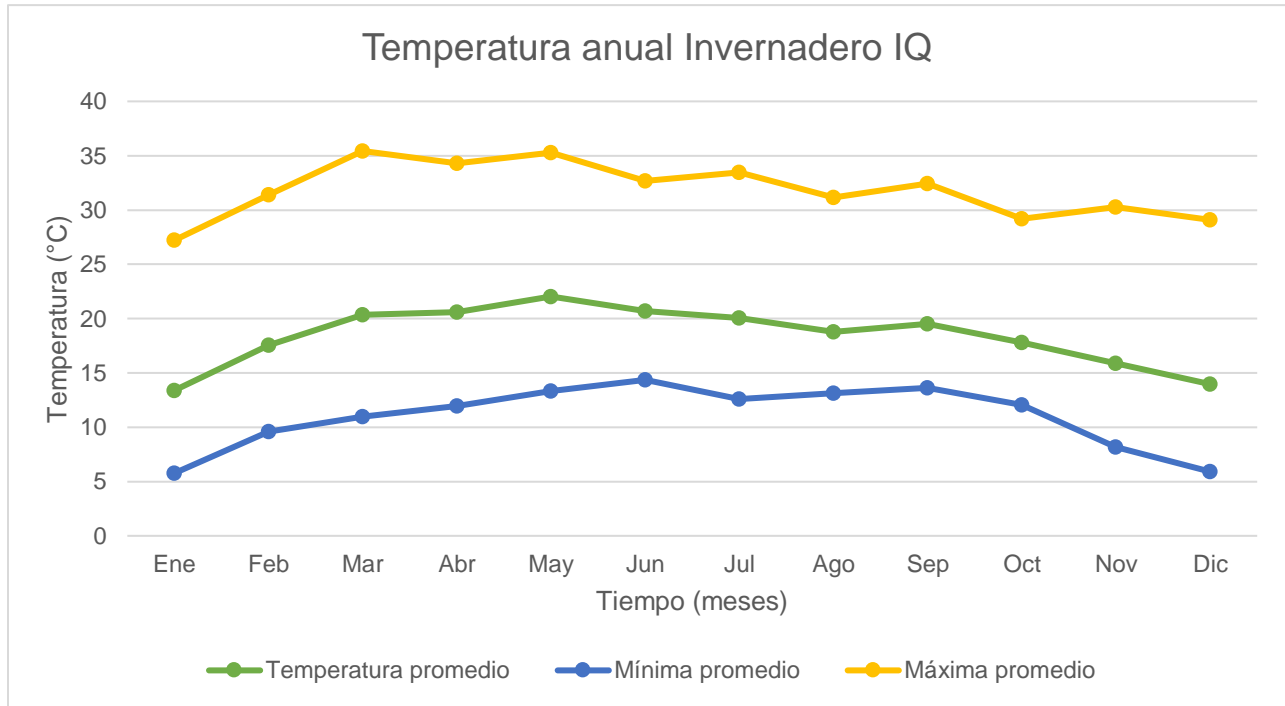
Zhu, Y., Liu, K. S., y Yiu, J. C. (2005). Effect of cutting method on bulb production of *Hippeastrum hybridum* in Taiwan. National Ilan University. Recuperado de: http://www.lib.teiep.gr/images/stories/acta/Acta%20673/673_71.pdf [05 de diciembre de 2018].

12 Anexos

Anexo 1



Anexo 2



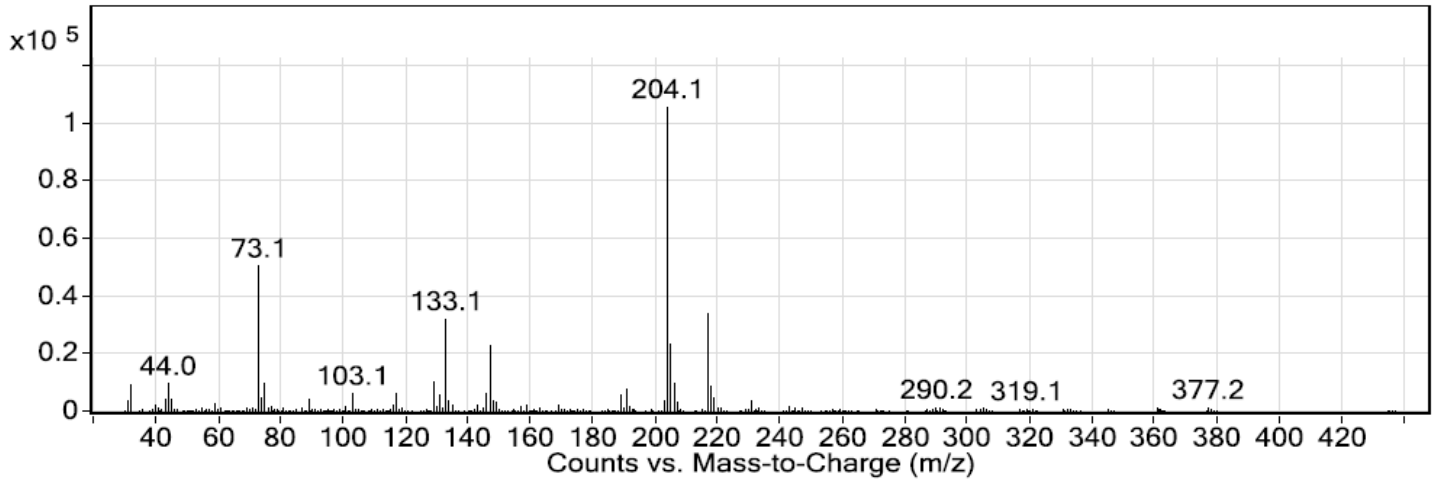
Anexo 3

Análisis estadístico obtenido en Statgraphics mostrando las diferencias significativas entre la biomasa inicial y final respecto al tipo de corte ($F=42.49$, $P=0$) se denotan las diferencias significativas de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$)

<i>Corte</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
5) escamas internas con AIB, Invernadero 2010, peso final.	0	XX
15) medios longitudinales con AIB, Invernadero 2010, peso final.	0	XX
4) escamas externas con AIB, Invernadero 2010, peso final.	0	XX
5) escamas internas con AIB, Rescate 2017, peso final.	0.205714	X
11) corte por mitad de la sección basal con AIB, Invernadero 2010, peso final.	0.926	XXX
2) escamas externas sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	1.4	XXXX
9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, Invernadero 2010, peso final.	1.464	XXXXX
5) escamas internas con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	1.642	XXXXXX
3) escamas internas sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	1.724	XXXXXX
9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, Rescate 2017, peso final.	2.12571	XXX
4) escamas externa con AIB, Rescate 2017, peso final.	2.27571	XXXX
3) escamas internas sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	2.414	XXXXXXX
5) escamas internas con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	3.15714	XXXXXXX
3) escamas internas sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	3.37571	XXXXXXX
7) corte longitudinal en cuartos con AIB, Invernadero 2010, peso final.	3.382	XXXXXXX
9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	3.572	XXXXXXX
8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	3.61	XXXXXXX
3) escamas internas sin AIB, Rescate 2017, peso final.	3.70143	XXXXXXX
8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	4.098	XXXXXXX
2) escamas externas sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	4.452	XXXXXXXXXX
4) escamas externas con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	4.518	XXXXXXXXXX
11) corte por mitad de la sección basal con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	5.428	XXXXXXXXXX
9) corte de la sección basal en cuartos con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	5.84	XXXXXXXXXX
8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	5.87714	XXXXXXXXXX
10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	6.252	XXXXXXXXXX
7) corte longitudinal en cuartos con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	6.628	XXXXXXXXXX
10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	6.976	XXXXXXXXXX
8) corte de la sección basal en cuartos sin AIB, Rescate 2017, peso final.	7.12714	XXXXXXXXXX
6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	7.696	XXXXXXXXXX
6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	8.08	XXXXXXXXXX
14) medios longitudinales sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	8.436	XXXXXXXXXX
15) medios longitudinales con AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	8.54	XXXXXXXXXX
14) medios longitudinales sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	8.584	XXXXXXXXXX
7) corte longitudinal en cuartos con AIB, Rescate 2017, peso final.	9.28714	XXXXXXXXXX
10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, Rescate 2017, peso final.	10.43	XXXXXXXXXX
4) escamas externas con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	10.6571	XXXXXXXXXX
2) escamas externas sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	11.8271	XXXXXXXXXX
10) corte por mitad de la sección basal sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	12.0029	XXXXXXXXXX
11) corte por mitad de la sección basal con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	12.1386	XXXXXXX
2) escamas externas sin AIB, Rescate 2017, peso final.	12.1671	XXXXXXX
7) corte longitudinal en cuartos con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	12.19	XXXXXXX
6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	12.5386	XXXXXXX
12) sección basal sin AIB, Invernadero 2010, peso inicial.	13.676	XXXXXXX
6) corte longitudinal en cuartos sin AIB, Rescate 2017, peso final.	14.2871	XXXXXXX
11) corte por mitad de la sección basal con AIB, Rescate 2017, peso final.	14.9443	XXXXXX
12) sección basal sin AIB, Invernadero 2010, peso final.	15.306	XXXXXXX
14) medios longitudinales sin AIB, Rescate 2017, peso final.	18.3271	XXXXXX
1) control, Invernadero 2010, peso inicial.	18.8625	XXXXXX
1) control, Invernadero 2010, peso final.	18.9375	XXXXXX
15) medios longitudinales con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	20.1043	XXXX
14) medios longitudinales sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	23.5971	XXXX
13) sección basal con AIB, Rescate 2017, peso inicial.	25.1543	XXX
12) sección basal sin AIB, Rescate 2017, peso inicial.	25.9914	XX
15) medios longitudinales con AIB, Rescate 2017, peso final.	27.18	XX
13) sección basal con AIB, Rescate 2017, peso final.	30.5829	X
12) sección basal sin AIB, Rescate 2017, peso final.	31.5043	X
1) control, Rescate 2017, peso inicial.	52.68	X
1) control, Rescate 2017, peso final.	57.4533	X

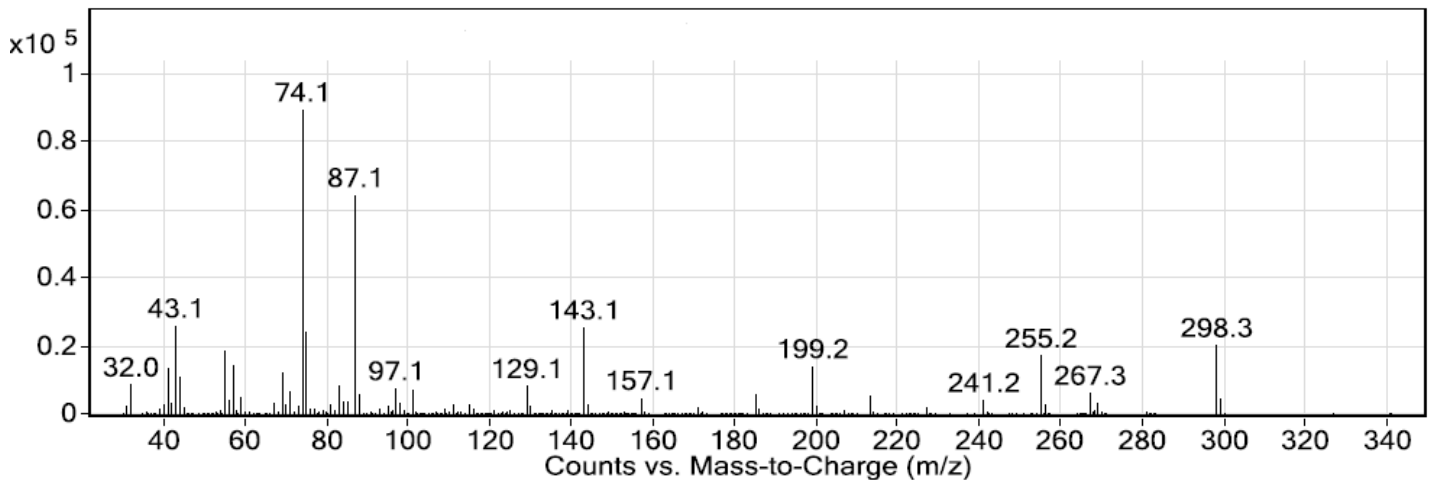
Anexo 4

Compuesto identificado por NIST como Metil galactosido (1S,2S,3S,4R,5R)-, 4TMS derivado (TR=8.97) presentó el patrón de fragmentación: 219 M⁺ (35%), 204.1 (100%), 133.1 (30%).



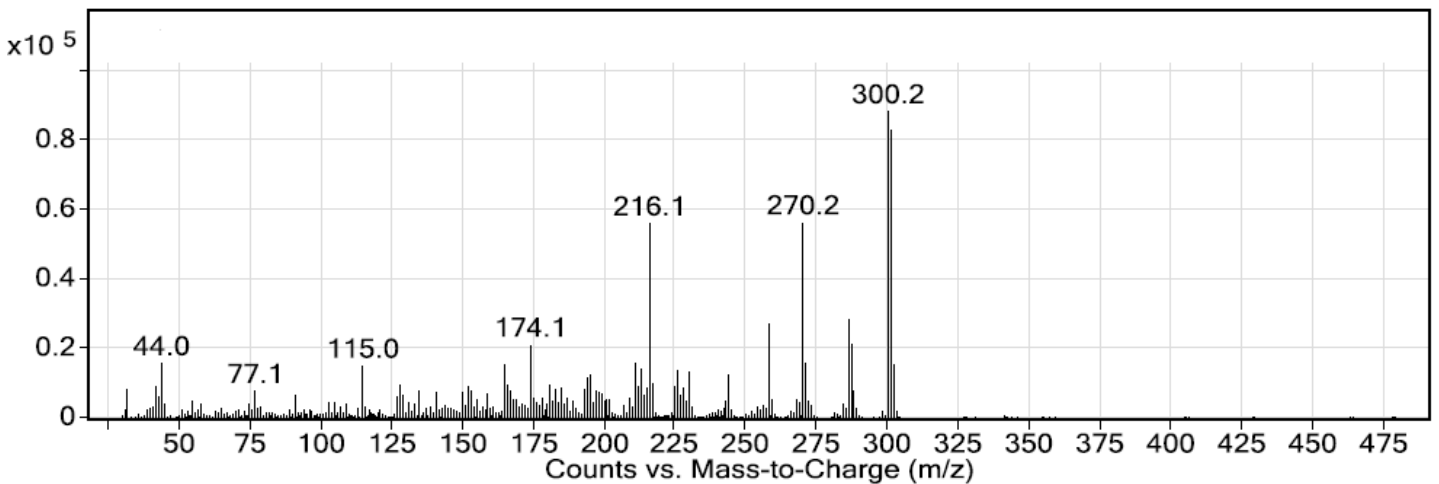
Anexo 5

Compuesto identificado por NIST como Metil esterato (TR=11.9) presentó el patrón de fragmentación: 298.3 M⁺ (25%), 143.1 (30%), 87.1 (75%), 74.1 (100%).



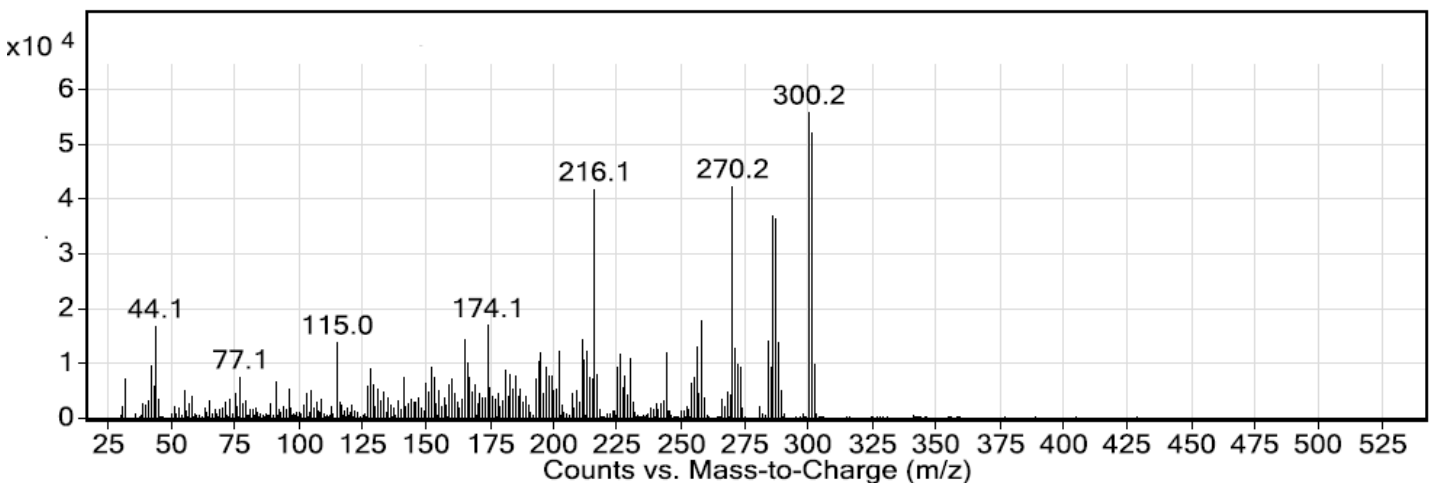
Anexo 6

Compuesto identificado por NIST como dihidrocodeína (TR=15.78) presentó el patrón de fragmentación: 301 M⁺ (95%), 300.2 (100%), 270.2 (76%) 270.2 (77%), 216 (75%). NOTA: éste espectro de masas, patrón de fragmentación y tiempo de retención fue idéntico al reportado por el compuesto del Anexo X, pero con diferente nombre.



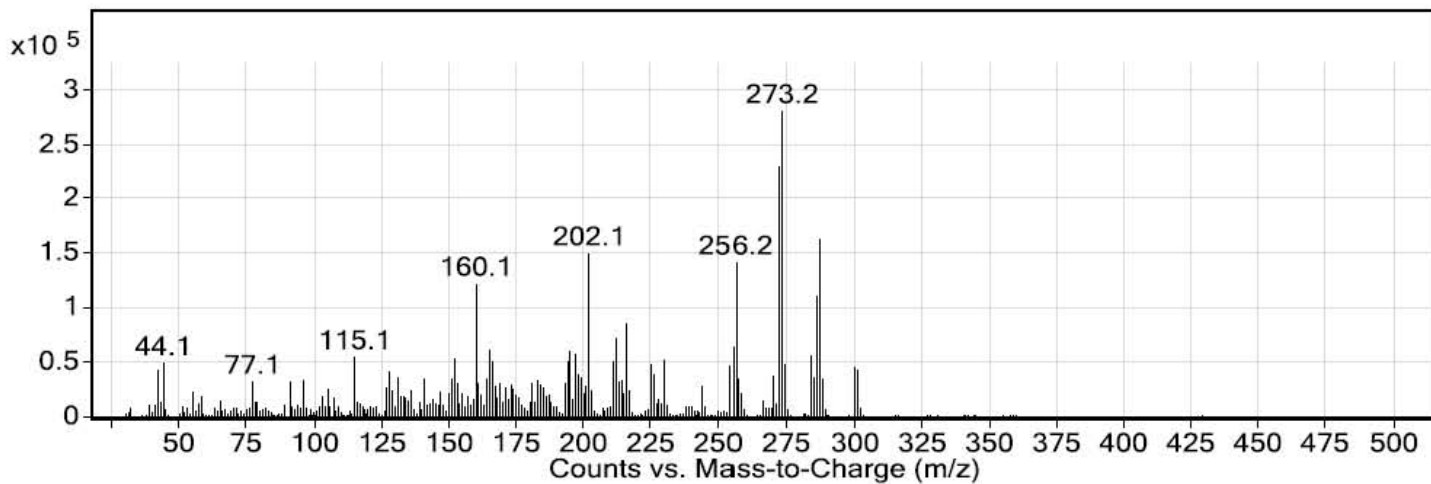
Anexo 7

Compuesto identificado por NIST como 2-Naftalencarboxamida, N-(1,3-difenil-3-oxo-1-propenil)- presentó el patrón de fragmentación: 301 M⁺ (95%), 300.2 (100%), 270.2 (76%) 270.2 (77%), 216 (75%).



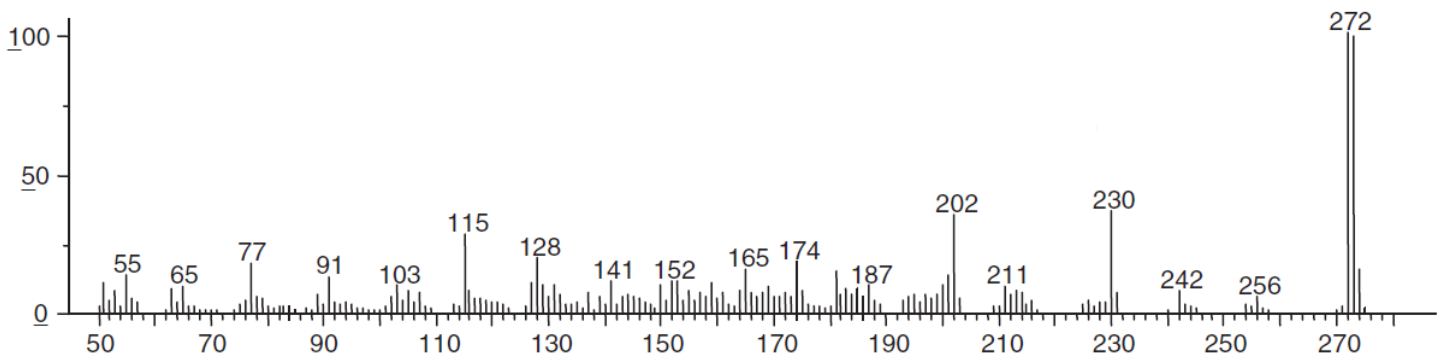
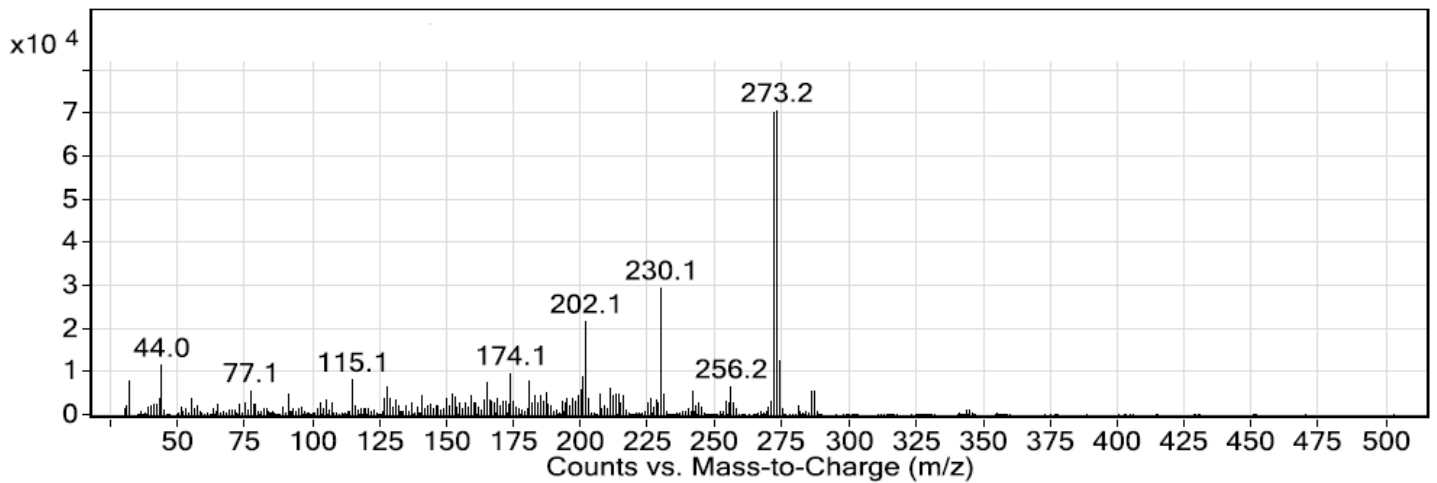
Anexo 8

Compuesto identificado por NIST como 6H-Dibenzo[b,d]piran-6-ona, 7,9-dihidroxi-3-metoxi-1-metil- (TR=15.83), presentó el patrón de fragmentación: 301 M⁺ (7.5%), 273.2 (100%), 256.2 (48.5%), 202.1 (55%).



Anexo 9

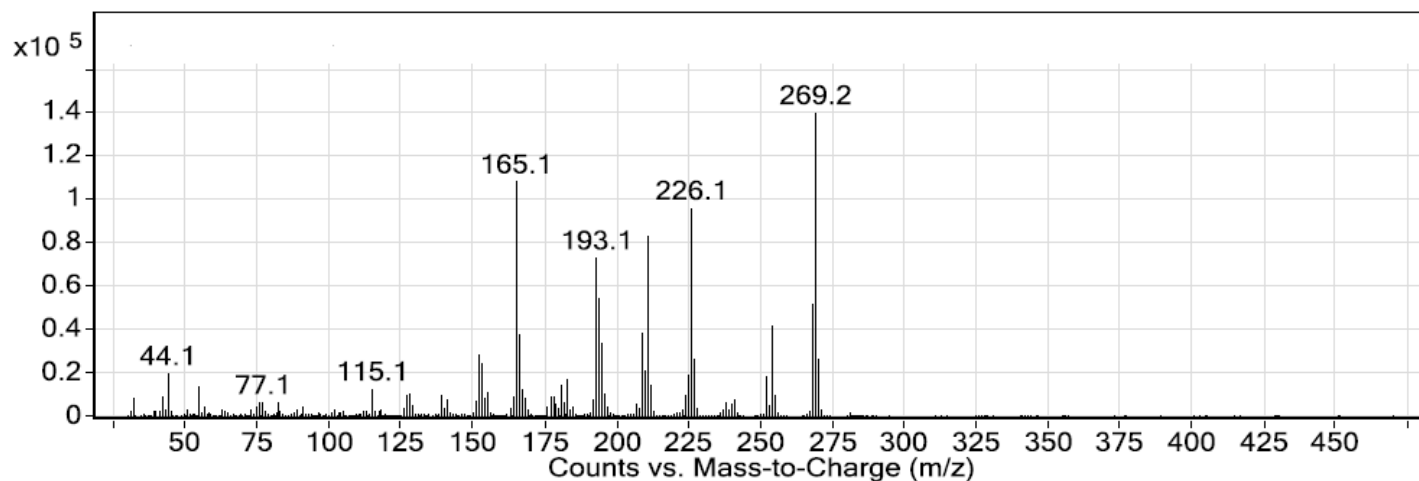
Compuesto identificado por NIST como 3,4,4a,5,6,7-Hexahidro-9,10-dimetoxi-2-oxo-2H-dibenzo(a,c)cicloheptano, (TR=16.07), presentó el patrón de fragmentación: 273.2 M+ (100%) 272 (98%), 256.2 (10%), 230.1 (45%), 202.1 (30%), sin embargo, de acuerdo a la comparación del espectro de masas reportado por Berkov *et al.*, (2012) tentativamente podría tratarse de epinorgalantamina, debido a la similitud del patrón de fragmentación.



Berkov *et al.*, (2012), modificado Soriano-García (2019).

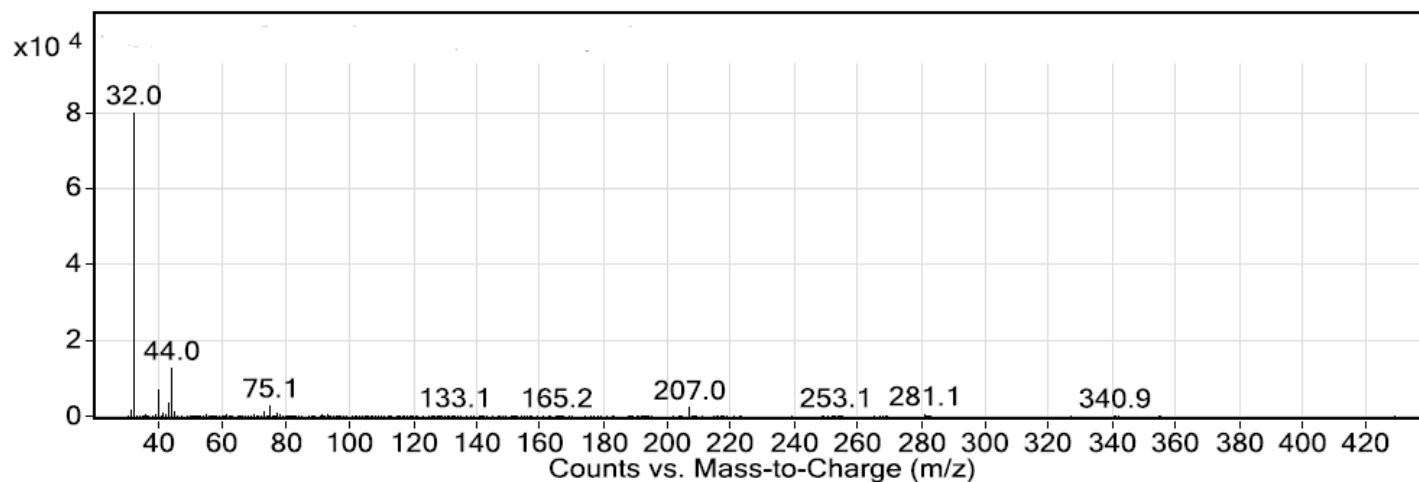
Anexo 10

Compuesto no identificado m/z 269.2/269.2 (TR=14.44), esta molécula presentó un patrón de fragmentación 269.2 M^+ (100%), 254.1 (7.5%), 226.1 (22.5%), 211.1 (43.5%), 165.1 (80%).



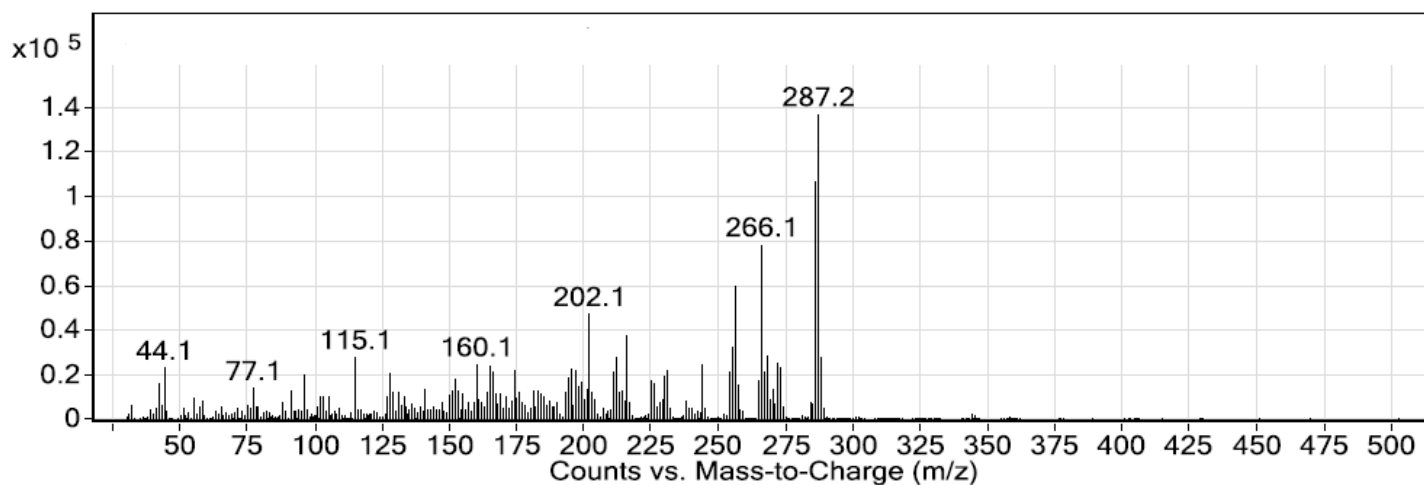
Anexo 11

Compuesto no identificado m/z 32/340.9 (TR=15.16) esta molécula presentó un patrón de fragmentación 340.9 M^+ (1%), 75.1 (5%), 44.0 (15%), 32.0 (100%).



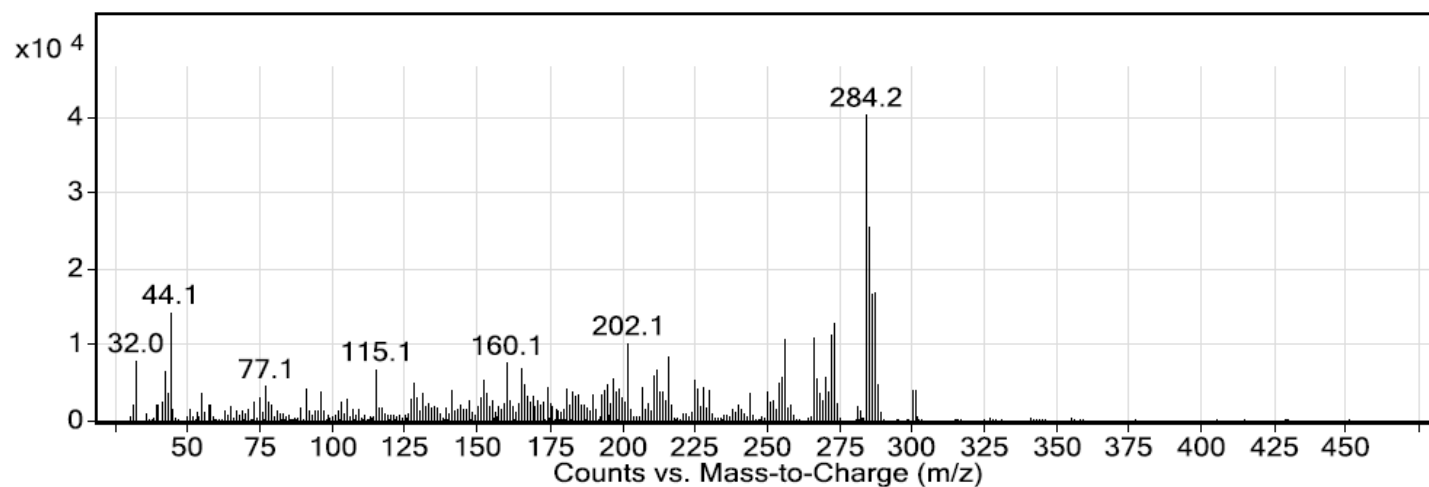
Anexo 12

Compuesto no identificado m/z 287.2/287.2 (TR=15.72), esta molécula presentó un TR similar al de la clidantina, sin embargo, su patrón de fragmentación fue distinto 287.2 M⁺ (100%), 266.1 (85 %), 202.1 (45%) por lo que se especula es algún compuesto relacionado.



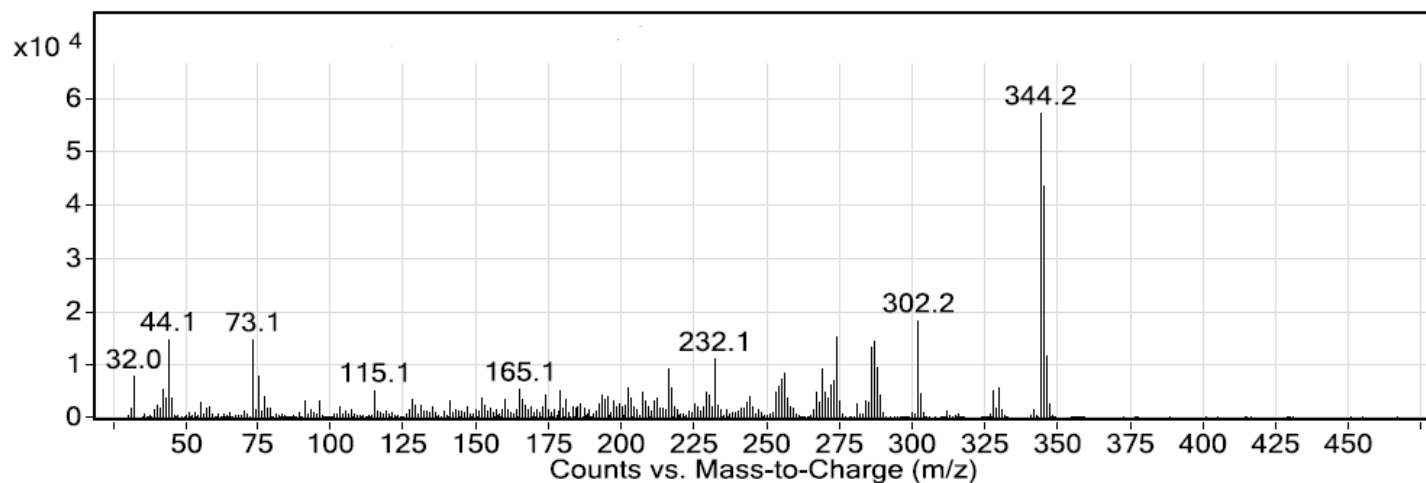
Anexo 13

Compuesto no identificado m/z 284.2/301 (TR=15.81), presentó el patrón de fragmentación: 301 M⁺ (9.5%), 284.2 (100%), 202.1 (23.8%).



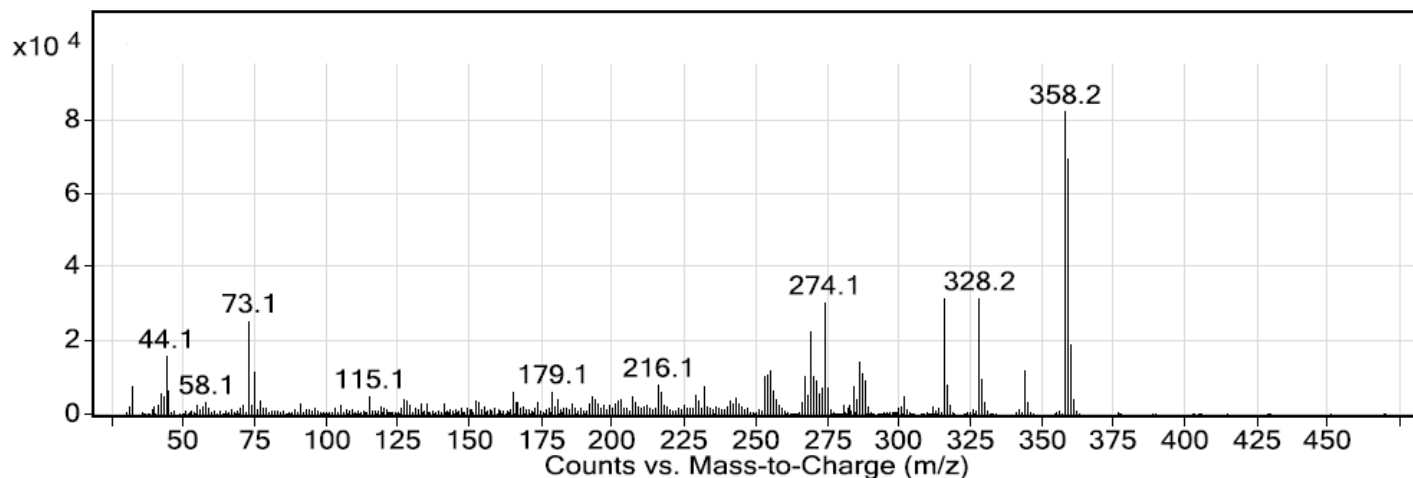
Anexo 14

Compuesto no identificado m/z 344.2/345 (TR=15.94), presentó el patrón de fragmentación 345 M⁺ (75%), 344.2 (100%), 302.2 (34%), 232.1 (20%).



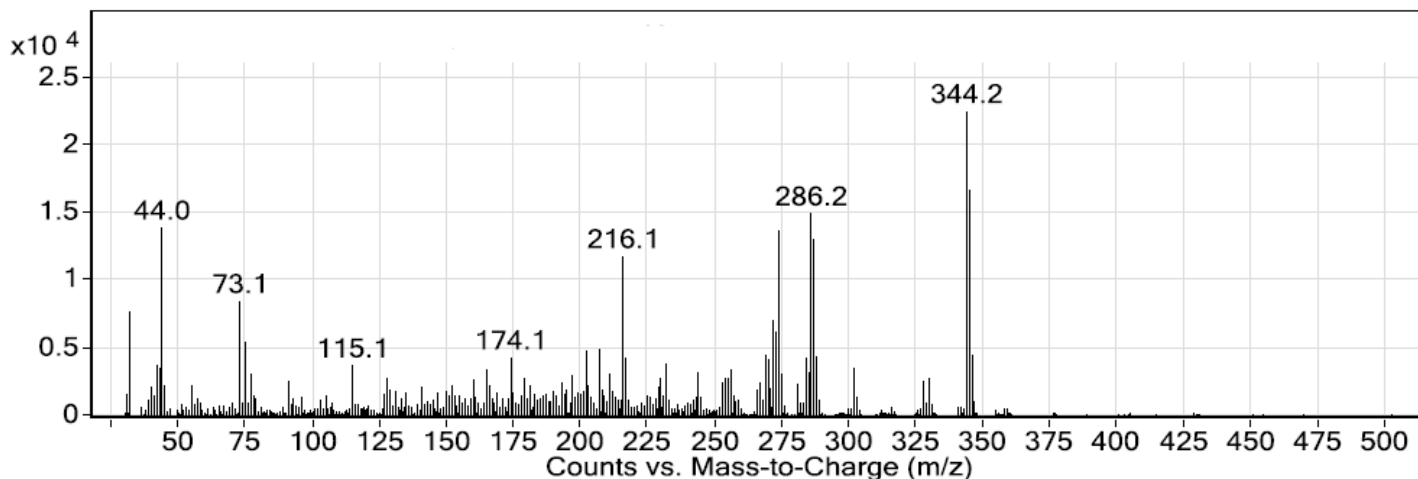
Anexo 15

Compuesto no identificado m/z 358.2/359 (TR=16.2), presentó el patrón de fragmentación: 359 M⁺ (85%), 358.2 (100%), 328.2 (42.5%), 274.1 (40%).



Anexo 16

Compuesto no identificado m/z 344.2/345 (TR=16.53), presentó el patrón de fragmentación: 345 M⁺ (75%), 344.2 (100%), 286.2 (70%), 216.1 (55%).



Anexo 17

Compuesto no identificado m/z 216.1/359.2 (TR=16.78–16.8), presentó el patrón de fragmentación: 359.2 M⁺ (65%), 316.2 (15%), 270.2 (17.5%), 216.1 (100%).

