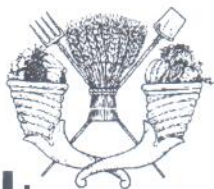


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



División de Ciencias Forestales

CULTIVO *in vitro* DE

***Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:
ANDRÉS FLORES GARCÍA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
JUNIO 2005



BIBLIOTECA DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

CULTIVO *in vitro* DE *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl

Tesis realizada por **Andrés Flores García** bajo la dirección del Comité Asesor indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:


MC. JOSÉ GUADALUPE ÁLVAREZ MOCTEZUMA

ASESOR:


DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:


MC. ALEJANDRO CORONA AMBRIZ

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació el día 8 de agosto de 1975 en el municipio de Perote, Veracruz. Su instrucción Primaria y Secundaria fue recibida en escuelas del mismo municipio. Posteriormente sus estudios de Preparatoria fueron realizados en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Continúo en dicha institución donde concluyó estudios de Licenciatura en el Departamento de la División de Ciencias Forestales obteniendo el título en Ingeniero Forestal con Orientación en Industrias en el año de 1998.

Su experiencia profesional da inició cuando ingresa a trabajar el un despacho de servicios técnicos forestales en 1999 en el estado de Veracruz. Posteriormente se incorpora a PRONARE en el estado de Chihuahua en el año 2001. A partir del año 2005 se desempeña como docente en el Instituto Tecnológico Superior de Perote y como Coordinador del Consejo Municipal de Desarrollo Rural Sustentable del H. Ayuntamiento de Perote, Ver.

AGRADECIMIENTOS GENERALES

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas instituciones y personas que colaboraron en el logro de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios y a la Comisión Nacional Forestal por su apoyo a través del proyecto de investigación titulado “Tecnologías para la restauración de los bosques en declinación del Distrito Federal” (CONAFOR-2002-C01-6181).

A la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias.

Al vivero forestal “Luis Tlahuac” ubicado en la delegación Xochimilco por proporcionarme la semilla de la especie.

Al MC José Guadalupe Álvarez-Moctezuma por la dirección del trabajo y por su apoyo, comprensión y atención hacia mí.

Al Dr. José Luis Rodríguez-De La O por su asesoría y experiencia invaluable vertida en este trabajo.

Al MC Alejandro Corona Ambriz por la revisión de este trabajo y sus aportaciones en el soporte estadístico.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo.

A todas aquellas personas que me apoyaron de manera directa o indirecta para la realización y culminación de la tesis.

DEDICATORIA

Para el vate que me ha mostrado lo que su pluma ha hecho...

...y en sus noches de desvelo escribió:

*La vida no es un instante, es la inmensidad del ser,
quien culmina, al comprender su belleza inexorable.*

Elvia

CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO II. GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE SEMILLAS DE	
<i>Nolina parviflora</i> (H.B.K.) Hemsl.....	4
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIÓN.....	16
CAPITULO III. RESPUESTAS ORGANOGÉNICAS <i>in vitro</i> DE	
<i>Nolina parviflora</i> (H.B.K.) Hemsl.....	20

RESUMEN.....	20
SUMMARY.....	21
INTRODUCCIÓN.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Multiplicación de brotes.....	24
Enraizamiento de brotes.....	26
Formación de callo.....	27
RESULTADOS.....	27
Multiplicación de brotes.....	27
Enraizamiento de brotes.....	29
Formación de callo.....	30
DISCUSIONES.....	30
Multiplicación de brotes.....	30
Enraizamiento de brotes.....	32
Formación de callo.....	33
CONCLUSIÓN.....	34
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	39
Establecimiento.....	39
Multiplicación de brotes.....	40
Enraizamiento de brotes.....	41
Formación de callo.....	41
CONCLUSIÓN GENERAL.....	42
LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Valores promedio de semillas contaminadas, colocadas en cajas de Petri dentro de sala de incubación e incubadora.....	17
2. Valores promedio de semillas contaminadas, colocadas en tubos de ensaye dentro de sala de incubación e incubadora.....	17
3. Longitud de la raíz de semilla, previamente sembrada en medio MS al 50 y 100%, colocadas en sala de incubación e incubadora. Los valores son el promedio de la longitud de raíz.....	18
4. Valores promedio de longitud de raíz, diámetro de raíz y número de raíces, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas y citocininas.....	35
5. Valores promedio de longitud de brote y ancho de brote, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas y citocininas.....	36
6. Valores promedio de longitud y diámetro de raíz del segmento basal del tallo, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Porcentaje de contaminación en semillas de <i>Nolina parviflora</i> colocadas en tubos de ensaye.....	18
2. Longitud de raíz de semilla obtenida con 4 tratamientos de medio MS.....	19
3. Germinación de semillas de <i>Nolina parviflora</i> sembradas en MS al 100% en incubadora, después de 4 semanas.....	19
4. Longitudes promedio de raíz (mm) del segmento basal de tallos obtenidos en cuatro tratamientos de auxina.....	38
5. Diámetros promedio de raíz (mm) del segmento basal de tallos obtenidos en cuatro tratamientos de auxina.....	38

RESUMEN

CULTIVO *in vitro* DE *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl

Nolina parviflora (H.B.K.) Hemsl, se distribuye en zonas cálidas y secas en los estados de Hidalgo, México, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz. El género tiene uso ornamental, medicinal y es empleado como materia para fabricar escobas de paja y canastos. En la reproducción, de las plántulas que nacen solo 39% logra sobrevivir ya que el potencial de los hongos patógenos son causas de la elevada mortalidad. Para su establecimiento *in vitro* se probaron tratamientos de desinfección con: Peróxido de Hidrógeno (3% v/v), Agua desionizada, Etanol (70% v/v) e Hipoclorito de Sodio (3% v/v); asimismo se evaluó las respuestas organogénicas empleando auxinas y citocininas: Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido indol-butírico (AIB), Ácido naftalanacetico (ANA), Ácido indol-acético (AIA), Benziladenina (BA) y Kinetina (KIN) respectivamente a diferentes concentraciones promoviendo exitosamente la inducción de organogénesis somática de la especie a partir de segmentos de tallos de plántulas.

PALABRAS CLAVE

Desinfección, Murashige and Skoog, 2,4-D, AIB, ANA, AIA, BA, KIN

SUMMARY

In vitro Cultivation of *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl

Nolina parviflora (H.B.K.) Hemsl is found in the dry, warm zones of the states of Hidalgo, Mexico, Puebla, San Luis Potosi and Veracruz. This genus is used for ornamental and medicinal purposes, and is also used as material in the manufacturing of straw brooms and baskets. Only about 39% of the plantlets/explants reproduced end up surviving, since there is a threat from pathogenic fungi that are the cause of this high mortality rate. Different disinfection treatments were tested for *in vitro* growth: hydrogen peroxide (3%v/v), de-ionized water, ethanol (70% v/v) and sodium hydrochloride (3%v/v). The organogenic responses were evaluated using auxines and cytokinins: 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-butyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA), indole-acetic acid (IAA), benzyladenine (BA) and kinetin (KIN) respectively at different concentration levels that successively encouraged the induction of somatic organogenesis in this species from the stem sections of the plantlets/shoot tips from the explants.

KEY WORDS

Disinfection, Murashige and Skoog, 2,4-D, IBA, NAA, IAA, BA, KIN

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

La degradación ambiental, la deforestación, el calentamiento global, el incremento en los niveles de radiación de rayos ultravioleta y la pérdida de tierras por la erosión, ejercen mayor presión sobre la infraestructura que existe en la continua oferta de alimento, mantención de oferta de materiales frescos para la industria y la producción de agricultura sustentable (Jain & Ishii, 1998 cit. por Mohan, 1999). Este es un problema serio para el desarrollo de los países debido al gran número de personas que usan árboles de los bosques como material combustible y para la construcción de casas. Por otra parte, las plantaciones forestales son con frecuencia destruidas, la incidencia de incendios forestales y la corta indiscriminada puede llevar a la pérdida invaluable de germoplasma (Sakurai, 1996; Rao, 1993 cit. por Mohan, 1999). La reforestación es un proceso lento por lo que se hace difícil de restaurar la vegetación del bosque primario (Jain, 1997 cit. por Mohan, 1999). Los métodos convencionales del empleo y selección de árboles con frecuencia limitaron las posibilidades de conseguir la demanda de un crecimiento rápido. Por lo tanto, surgió la necesidad de innovar nuevas tecnologías efectivas para desarrollar nuevos híbridos, la selección temprana y la prueba de genotipos deseables, y la rápida propagación vegetativa de los genotipos seleccionados. Jain & Ishii (1998, cit. por Mohan, 1999) sugieren la necesidad de producir bancos genéticamente uniformes de los genotipos élites seleccionados del material plantado, establecimiento de bancos de

germoplasma, y la prueba de su resistencia hacia agentes abióticos y bióticos por estrés ambiental.

El cultivo *in vitro* de tejidos ha tomado gran importancia en la regeneración de plantas y tiene un gran potencial para proveer y multiplicar rápido el material élite para una producción a gran escala en un corto tiempo (Ahuja, 1992; Bonga & von Aderkas, 1992; Jain *et al*, 1995, 1998; Jain & Ishii, 1998 cit. por Mohan, 1999). Esta tecnología es importante para las plantas maderables que tienen un largo ciclo de vida y presentan dificultad para multiplicarse por los métodos convencionales. Diversas especies maderables son importantes tales como las leguminosas, coníferas, etc.; algunas no pueden ser mejoradas por medio de la selección de árboles élites para la producción de semilla por su propia incompatibilidad o baja viabilidad. Esta es una labor altamente intensiva y costosa, ya esta siendo ampliamente utilizada en los países desarrollados (Jain, 1999 cit., por Mohan, 1999). Eventualmente, el cultivo de tejidos provera de medios primarios para la propagación clonal (Trigiano *et al*, 1992 cit. por Mohan, 1999).

Por otra parte, dentro del recurso forestal existen los denominados “no maderables” los cuales han sido aprovechados por largos periodos dentro de las áreas en que estos prevalecen. Específicamente, dentro de tal grupo se encuentra la palma cortante (*Nolina parviflora*), la cual es una especie que se ha empleado con fines de restauración ecológica, ornamental u otros usos. Sin embargo, estudios anteriores han indicado que el fuego y las enfermedades fungosas sean un factor que obstaculizan la propagación de la planta, y su reemplazo resulta lento en lugares donde ocurre su propagación (López, 1986). Asimismo, forma parte de una cadena económica, debido a que es elemento complementario a la subsistencia de las familias de las zonas semiáridas, por ser materia prima para el abastecimiento a industrias. Por tal razón, resulta de

importancia y justificación, realizar la propagación *in vitro* para contar con alternativas de apoyo a la producción de plantas, lo que permitirá la regeneración y recuperación de áreas en tiempos más cortos.

CAPÍTULO II

GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE

Nolina parviflora (H.B.K.) Hemsl¹

A. Flores-García^{2¶}; J. G. Álvarez-Moctezuma²; J. L. Rodríguez-De La O³;

A. Corona-Ambriz².

²División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. C.P. 56230. Chapingo. México. Tel. (595)952-1500 ext 5468 ó 5492. Fax: (595)952-1637.

³Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. A.P. 37. C.P. 56230. Chapingo. México. Tel. (595)952-1500 ext 6236 ó 6325.

Correo electrónico: fogal2@yahoo.com.mx ([¶]responsable); jogualmo@chapingo.mx; jrguez@taurus1.chapingo.mx; ambrizcor@yahoo.com.mx

RESUMEN

La palma *Nolina parviflora* tiene uso ornamental, artesanía y techado. Su reproducción sexual es tardía y solo 39% de las plántulas logra sobrevivir debido a hongos patógenos. Para su germinación *in vitro* se probaron desinfectantes (H₂O₂,

¹ Flores G., A., J. G. Álvarez M., J. L. Rodríguez de la O y A. Conona A. Será sometido a la Revista Agrociencia

CH₃OH, NaOCl), agitado y condiciones de incubación. El mejor tratamiento fue sumergir la semilla en H₂O₂ y agitación, con 55% de germinación.

PALABRAS CLAVE

Desinfección, H₂O₂, CH₃OH, NaOCl

SUMMARY

The *Nolina parviflora* palm is used as an ornamental plant, for making handicrafts, and for thatching roofs. Its sexual reproduction is late, and just 39% of its plantlets survive, due to fungi. For *in vitro* germination, disinfectants (H₂O₂, CH₃OH, NaOCl), incubation conditions, and the results of shaking in shaker machines were evaluated. The best treatment, which had 55% germination, was achieved through dipping seed in H₂O₂ and then shaking the contents.

KEY WORDS

Disinfection, H₂O₂, CH₃OH, NaOCl.

INTRODUCCIÓN

La palma cortante ó sotolín (*Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl, Nolinaceae) es una planta arborescente distribuida en zonas cálidas y secas (Rzedowski, 1978) en los estados de Hidalgo, México, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz (Reyes, 2002). Sinonimias: *Cordyline parviflora* H.B.K. y *Nolina altamiranoa* Rose. (Calderón y Rzedowski, 2001).

El género *Nolina* se emplea por familias de zonas áridas y semiáridas como materia prima para fabricar escobas de paja, canastos y techado de casas (Krotchamal, *et al.* 1954 cit. por Reyes, 2002); tiene uso medicinal y etnobotánico (Gioanetto y Franco, 2004). Es utilizado como fuente de alimento para ganado (*Nolina texana*) (Cruse, 1949 cit. por Reyes, 2002), además de tener un uso ornamental (Hernández, 1987; Infojardin, 2004). Se obtiene una fibra dura que se mezcla con sorgo escobero para elaborar escobas, cepillos y muebles rústicos; asimismo se utiliza en la fabricación de discos para barredoras mecánicas y cartuchos de explosivos (Castillo, *et al.*, 2004).

Para *Nolina parviflora* el fuego es un factor que obstaculiza la propagación natural de la planta y su reemplazo resulta lento en los lugares en donde ocurren incendios forestales (López, 1986). Por otra parte, una supresión en la frecuencia del fuego puede afectar la viabilidad de las poblaciones por reducción en la diversidad genética (FWS, 2004).

Los ambientes en que se desarrolla la especie son fuentes de mortalidad para las plántulas ya que están expuestos a la interacción de periodos prolongados de sequedad y la ocurrencia frecuente de temperaturas bajas extremas (López, 1986).

La primera reproducción de la planta se lleva a cabo aproximadamente a los 68 años en promedio; de las plántulas que nacen solo 39% logra sobrevivir. Es importante considerar que el potencial de los hongos patógenos son probables causas biológicas de la elevada mortalidad de plántulas (López, 1986).

Por otra parte, la necesidad de mitigar la degradación progresiva del recurso *Nolina* obliga a experimentar las técnicas *in vitro*, como el cultivo de tejidos. Esta tecnología demanda una serie de procedimientos previos entre los que se encuentran los bioensayos que permiten obtener material aséptico para posteriormente utilizarlo como

fuelle de explante (Pierik, 1990). Por esta razón y para esta especie en particular fue preciso probar diferentes métodos de desinfección de semillas y con ello estimular su germinación hasta obtener plántulas que se utilizaran en las etapas posteriores de su propagación mediante la técnica de cultivo de tejidos.

El objetivo de este trabajo fue el establecimiento aséptico de semillas y promover su germinación hasta obtener plántulas completas, utilizadas posteriormente como fuente de explante, a fin de apoyar a investigaciones posteriores concernientes a la propagación *in vitro* de la especie *Nolina parviflora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Nolina parviflora* se adquirieron en el vivero forestal San Luis Tlahuac ubicado en la delegación Xochimilco. El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

La investigación se dividió en dos etapas, la primera consistió en determinar el mejor desinfectante de semillas y la segunda en encontrar el mejor medio para la germinación de las mismas.

Las semillas fueron lavadas detalladamente con jabón detergente disuelto en agua; posteriormente, fueron enjuagadas con agua corriente. Las semillas se sometieron a varias soluciones químicas que se utilizaron como desinfectantes con el propósito de determinar el mejor. Dichas soluciones eran: Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (3% v/v), agua desionizada, etanol (CH₃OH) (70% v/v) e hipoclorito de sodio (NaOCl) (3% v/v);

las cuales se tomaron como tratamientos, junto con el testigo al cual no se le aplicó ninguna solución.

Una vez tratadas las semillas se pusieron en cajas de Petri para después colocarlas en sala de incubación e incubadora. Los tratamientos sembrados en cajas de Petri estaban compuestos cada uno de 15 semillas, estos fueron: tratamiento 1 semillas colocadas en un frasco que contenía agua desionizada; tratamiento 2 semillas colocadas en un frasco que contenía Peróxido de Hidrógeno. Ambos frascos estuvieron en agitación (Orbit Shaker) por 24 horas.

Para el tratamiento 3 las semillas fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos. El tratamiento 4 consistió en sumergir las semillas en etanol al 70% por un tiempo de 1 minuto e hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos. Ambos tratamientos fueron enjuagados con agua esterilizada. El testigo correspondió al tratamiento 5.

Las cajas de Petri fueron situadas tanto en sala de incubación (tratamientos 1, 2, 3 y 5) como en incubadora (tratamientos 1, 2, 4 y 5) bajo ambiente controlado. En la sala de incubación la iluminación se proporcionó por lámparas fluorescentes DURO-TEST (SlimLine) de 75 W, a una temperatura de 25° C ($\pm 2^\circ$ C) y bajo una intensidad luminosa de $28.05 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; en la incubadora se incubó a oscuridad, a una temperatura constante de 25° C durante 24 horas.

Los tratamientos sembrados en tubos de ensaye contenían medio básico de sales inorgánicas de MS al 50 y 100% (3 semillas por tubo), los cuales fueron: tratamiento 1 semillas sumergidas en Peróxido de Hidrógeno y agitadas por 24 horas, tratamiento 2

semillas sumergidas en etanol al 70% por un tiempo de 1 minuto y en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, tratamiento 3 semillas sumergidas en etanol al 70% por un tiempo de 1 minuto y en hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos, tratamiento 4 semillas sumergidas en etanol al 70% por un tiempo de 1 minuto, tratamiento 5 semillas sumergidas en hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, tratamiento 6 semillas sumergidas en hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos, tratamiento 7 corresponde al testigo. Los tubos de ensaye fueron colocados en la sala de incubación e incubadora bajo las mismas condiciones que las cajas de Petri.

El diseño experimental empleado tanto para cajas de Petri como tubos de ensaye fue completamente al azar. El periodo de incubación para cajas de Petri fue de 17 días, mientras que el de tubos de ensaye fue de 32 días. Los análisis estadísticos se realizaron hasta los días finales de incubación.

La variable a evaluar fue la presencia de contaminación de la semilla por hongo o bacteria. El análisis de los datos fue aplicando un método no paramétrico empleando la comparación múltiple de tratamientos basada en el procedimiento de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del $\alpha = 5\%$.

Una vez determinado el mejor método de desinfección, se sembró semillas en medio básico de sales inorgánicas MS al 50 y 100 % para determinar bajo que condición de incubación (sala de incubación ó incubadora) las semillas durante su germinación presentaban un mejor desarrollo. Se depositaron 3 semillas en cada tubo de ensaye de 25 x 150 mm con 15 ml de medio de cultivo, los tubos fueron tapados y sellados con parafilm, el tiempo de incubación fue de 14 días.

Para la evaluación de la germinación la variable a medir fue la longitud de la raíz; para lo cual se hizo un análisis de varianza bajo el diseño experimental completamente

al azar; donde la hipótesis a probar fue $H_0: \tau_1=\tau_2=\tau_3= \dots =\tau_i$ versus H_1 : al menos un $\tau_j \neq 0$. En caso de rechazar la hipótesis nula (H_0), se realizó una comparación de medias a través del método t, el cual se basa en la Diferencia Mínima Significativa (DMS) con el propósito de determinar los tratamientos que tenía un efecto significativo con respecto a los demás.

Todo el medio de cultivo preparado fue ajustado a un pH de 5.7 ± 1 y esterilizado por 20 minutos a 120°C y 1.5 kg/cm^2 de presión. Asimismo, antes de la siembra todo el material de laboratorio se esterilizó en autoclave por un tiempo de 40 minutos a una temperatura de 120°C y 1.5 kg/cm^2 .

RESULTADOS

En la desinfección de semilla los análisis de varianza mostraron que al menos uno de los tratamientos fue estadísticamente diferente, lo que significó que existía diferencias entre los tratamientos con respecto al nivel de contaminación de las semillas; puesto que la variable a evaluar era la contaminación, debido a la presencia de hongos se considera como los mejores tratamientos aquellos que obtuvieron los valores más bajos (Cuadros 1 y 2).

Con respecto a las semillas sembradas en cajas de Petri al emplear el tratamiento 2 colocado en incubadora se obtuvo un 100% de material sin contaminantes, pero cuando estuvo en la sala de incubación se obtuvo un 6% de contaminación (hongos) y al final del tiempo de incubación el 84% del material se encontraba libre de patógenos.

El tratamiento 4 que consistió en exponer las semillas a etanol al 70% por 1 minuto e hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos presentó al final del tiempo de incubación contaminación en un 40%.

El resto de los tratamientos presentaron contaminación del 100% al final del tiempo de incubación que fueron 17 días. Lo anterior demostró que los tratamientos 2 (incubadora y sala de incubación) y 4 (incubadora), son los que permitieron obtener semilla libre de patógenos.

En lo que refiere a las semillas sembradas en tubos de ensaye sólo existió contaminación por hongos, los tratamientos 4 y 6 en MS al 50% en incubadora presentaron el 11% de contaminación. El tratamiento 4 en MS al 100% en sala de incubación, tratamiento 2 en MS al 50% en incubadora y testigo en MS al 50% en incubadora presentaron el 22% de contaminación. El 33% de contaminación se presentó en los tratamientos 5 en MS al 50% en incubadora, 3 y 7 en MS al 100% en incubadora (Figura 1). El resto de los tratamientos presentaron contaminación del 100% al final del tiempo de incubación. Ninguno de estos tratamientos mostró germinación hasta el tiempo final de evaluación que fue de 32 días.

El mejor tratamiento de desinfección fue el 1 que involucró Peróxido de Hidrógeno, agitación por 24 horas y sembradas en medios básicos de sales inorgánicas de MS al 50 y 100%, no mostraron contaminación ni en la sala de incubación ni en incubadora. El porcentaje de germinación logrado fue de 55.55% en un tiempo de 32 días; únicamente se obtuvo emergencia de radícula ya que hasta ese momento no había desarrollo de tallo. El resto de los tratamientos no mencionados presentaron un 100% de contaminación.

Bajo la prueba de F que existía diferencia significativa entre tratamientos; la prueba de "t" para la comparación de medias entre tratamientos indicó que el tratamiento que resultó estadísticamente diferente a lo demás y que produce un mayor efecto en desarrollo de la raíz durante la germinación de la semilla fue el basado en el empleo de Peróxido de Hidrógeno a la semilla, sembrada en MS al 100% y colocado en incubadora (Cuadro 3).

Por lo tanto, este tratamiento es el más idóneo para trabajar en laboratorio ya que al final de la investigación se observó una mayor longitud de raíz de las semillas de *Nolina parviflora* (Figuras 2 y 3).

DISCUSIÓN

En este trabajo el mejor tratamiento fue sumergir la semilla en peróxido de hidrogeno (3%) y agitación durante 24 horas. Otras especies forestales donde este tratamiento ha sido eficaz es *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* en donde se sumergió en Peróxido de Hidrógeno (3%) por 5 horas (Dumroese, *et al.*, 1988); *Pinus ponderosa* redujo significativamente los niveles de *Fusarium* (James y Genz, 1981). En especies no forestales como el género *Tillandsia* también se han obtenido resultados favorables (Slack, 2003), asimismo la desinfección de semilla de arroz ante la bacteria *Burkholderia vietnamiensis* tuvo buenos resultados cuando se combinó Peróxido de Hidrógeno (10%) por 10 minutos con hipoclorito de calcio (1%) por 1 hora (Miché y Balandreau, 2001).

Además de la efectiva capacidad de esterilización en semillas forestales el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) ha demostrado incrementar la germinación en algunas

semillas de pino; porque ablanda su testa e incrementa la permeabilidad del agua y oxígeno (Barnett, 1998). El H_2O_2 tiene más capacidad de oxidación que el cloro o el dióxido de cloro debido a sus fuertes propiedades oxidativas, dentro de sus usos se emplea como agente desinfectante (Lenntech, 2004; Barnett, 1998); además de ser sus moléculas degradables en agua (ASTRE, 2004) liberando oxígeno molecular y agua sin dejar residuos tóxicos (Barnett, 1998). En concentraciones del 10-20% produce quemaduras a los tejidos expuestos a él (ASTRE, 2004). Se ha comprobado que es bactericida, virucida y fungicida (HRM, 1993). Para el caso de la desinfección de semilla, las bacterias que existen en ella no presentan enzimas como la catalasa ó peroxidasa capaces de degradar el Peróxido de Hidrógeno como agua y oxígeno, y por lo tanto, no pueden eliminar los productos nocivos resultantes del oxígeno (Iáñez, 1998). De hecho un problema a nivel celular es la degradación del Peróxido de Hidrógeno, sustancia muy tóxica para la célula ya que oxida y destruye los componentes de su membrana y enzimas; por ello la célula contiene peroxisomas que son orgánulos constituidos por enzimas como la catalasa que degradan el H_2O_2 (Iáñez, 1998; Bonnet, 2004; Mateos, 2004). Un factor importante cuando se aplica H_2O_2 es la agitación de la semilla puesto que se minimiza la demanda química del oxígeno (Rodríguez, *et al.*, 2004), la velocidad de agitación es importante pues asegura un suministro adecuado del oxígeno (Sánchez, 2004). Cuando se hace la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por bacterias (Riofrio, 2004).

Otro tratamiento muy efectivo en especies forestales es un fungicida Bavistin al 0.2%, p/v, 30 minutos y cloruro de mercurio al 0.05%. p/v, 10 minutos para *Quercus leucotrichophora* y *Q. glauca* (Purohit, *et al.*, 2002). Para 6 familias de pino se realizó exitosamente la inmersión en etanol al 70% v/v por 30 segundos y en cloruro de

mercurio al 0.1% por 20 minutos (Tang y Ouyang, 1999). Asimismo, se ha empleado Lavandina® al 50% en *Pinus tadea* (Niella y Rocha, 2004) lográndose buenos resultados en la desinfección de la semilla.

Para otras especies como *Agave parrasana* fue efectivo sumergir en etanol al 70% por 30 segundos e inmersas por 10 minutos en hipoclorito de sodio comercial al 50% (concentración final de 3% de hipoclorito de sodio) (Santacruz, *et al.*, 1999); semilla de *Agave victoriae-reginae* se desinfectaron con etanol al 70% (v/v) por 1 minuto después agitadas en hipoclorito de sodio doméstico (1.2% v/v NaOCl) por 20 minutos (Martínez, *et al.*, 2003) en *Tagetes erecta* las semillas fueron desinfectadas con etanol completo, etanol al 70% por 5 minutos, hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos (Venegas, *et al.*, 2002). Para semillas de *Lilium x formolongi* se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 1% (p/v) por 10 minutos (Shimasaki y Fukumoto, 2000).

Esta ampliamente comprobado que la aplicación de cloro en los procesos de desinfección tiene un efecto positivo en la eliminación de microorganismos resistentes, por efectos de la cloración (Castro, 1992), es eficaz en la mayoría de las bacterias patógenas, pero de acción imprevisible contra hongos y virus (HRM, 1993); destruye los organismos al ser inactivados mediante la oxidación del material celular (EPA, 1999). La muerte de los microorganismos se debe a la combinación directa del cloro con las proteínas de las membranas celulares y las enzimas. Así mismo, en presencia de agua desprende oxígeno nascente (O₂) que oxida la materia orgánica (Mateos, 2004).

Por otra parte el etanol actúa desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agente deshidratante, es letal para bacterias pero irregular para hongos y virus, no actúa sobre las esporas; al combinarlo con antisépticos de otro grupo

tiene una mayor acción germicida (Mateos, 2004; UCh, 2004). El cloruro de mercurio actúa alterando la permeabilidad y coagulando las proteínas celulares (Mateos, 2004), por ser un compuesto mercurial requiere altas concentraciones para alcanzar un efecto bactericida (HRM, 1993).

En cuanto a la germinación se obtuvo un 55% bajo las condiciones preestablecidas. Para esta especie si las semillas se remojan en agua por 24 horas y se colocan a un temperaturas de 20° y 25° C se obtendrá germinaciones del 87.5% y 85% respectivamente, ambos casos en ausencia de luz (Reyes, 2002). En *Nolina recurvata* ocurrió cuando la semilla estuvo a una temperatura de 20° C (Faucon, 2004); en caso de que las semillas fueran previamente sumergidas en agua caliente por cuatro horas y colocadas a 26° C se obtuvo un 80% de germinación en el primer mes (Mário, 2003).

En géneros de la misma familia como *Yucca glauca* se ha determinado que sus tasas de germinación van desde 45 a 98% pero generalmente el promedio es de 80 a 90% bajo condiciones de laboratorio (Alexander, *et al.* 1974 cit. por USDA Forest Service, 2004) y las temperaturas óptimas son de 28° – 32° C (UF, 2005); en *Yucca rostrata* si las semillas son agitadas por un día en agua y colocadas en bolsas ziploc con peat moss de obtendrá una germinación del 100 % (Glavin, 2005).

No fue posible manejar la semilla sin la previa desinfección ya que existía la presencia de hongos. No se reporta que alguna especie del género *Nolina* pueda ser producida *in vitro* sin algún tratamiento de esterilización. Cabe aclarar que se mantuvieron plántulas desarrolladas *in vitro* libre de contaminación por más de cuatro meses, sin la presencia de hongos por lo que el método de desinfección es una buena estrategia para la limpieza de la semilla.

CONCLUSIÓN

Con la presente investigación se determinó que el mejor tratamiento para la desinfección de semilla de *Nolina parviflora* es sumergir la semilla en Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y mantenerla en agitación por 24 horas, logrando un porcentaje de germinación del 55% en un tiempo de 32 días.

Cuadro 1. Valores promedio de semillas contaminadas, colocadas en cajas de Petri dentro de sala de incubación e incubadora.

Tratamiento	Sala de incubación	Incubadora
1.- Agua desionizada	15 d ^z	15 d
2.- H ₂ O ₂	1 b	0 a
3.- NaOCl (5 min.)	15 d	----- ^y
4.- CH ₃ OH (1 min.) + NaOCl (10 min.)	----- ^y	6 c
5.- Testigo	15 d	15 d

^zValores con letras iguales dentro de cada columna implica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, (Chi-S=98.2246, $\alpha = 0.05$).

^yPrueba no realizada.

Cuadro 2. Valores promedio de semillas contaminadas, colocadas en tubos de ensaye dentro de sala de incubación e incubadora.

TRATAMIENTO	MS al 50%		MS al 100%	
	Sala de incubación	Incubadora	Sala de incubación	Incubadora
1.- H ₂ O ₂	0.00 a ^x	0.00 a	0.00 a	0.00 a
2.- CH ₃ OH + NaOCl (5 min.)	3.00 e	0.66 c	3.00 e	3.00 e
3.- CH ₃ OH + NaOCl (10 min.)	3.00 e	3.00 e	3.00 e	1.00 d
4.- CH ₃ OH	3.00 e	0.33 b	3.00 e	0.66 c
5.- NaOCl (5 min.)	3.00 e	1.00 d	3.00 e	3.00 e
6.- NaOCl (10 min.)	3.00 e	0.33 b	3.00 e	3.00 e
7.- Testigo	3.00 e	0.66 c	3.00 e	1.00 d

^xValores con letras iguales implica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, (Chi-S=76.5271, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 3. Longitud de la raíz de semilla, previamente sembrada en medio MS al 50 y 100%, colocadas en sala de incubación e incubadora. Los valores son el promedio de la longitud de raíz.

Tratamiento	Longitud de raíz (mm)
Peróxido de Hidrógeno, MS al 50%, sala de incubación	3.058 b ^w
Peróxido de Hidrógeno, MS al 100%, sala de incubación	3.743 b
Peróxido de Hidrógeno, MS al 50%, incubadora	7.612 b
Peróxido de Hidrógeno, MS al 100%, incubadora	19.400 a

^wTratamientos con letras iguales indica que no existe diferencia significativa (DMS=8.2565, $\alpha = 0.05$).

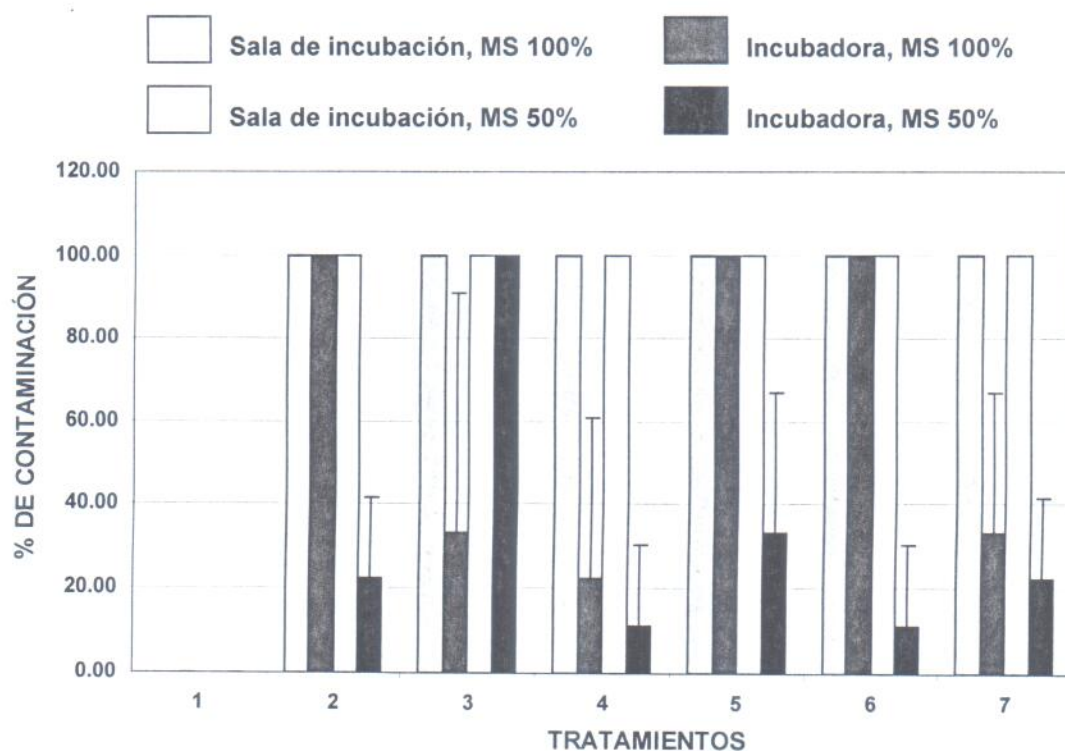


Figura 1. Porcentaje de contaminación en semillas de *Nolina parviflora* colocadas en tubos de ensaye.

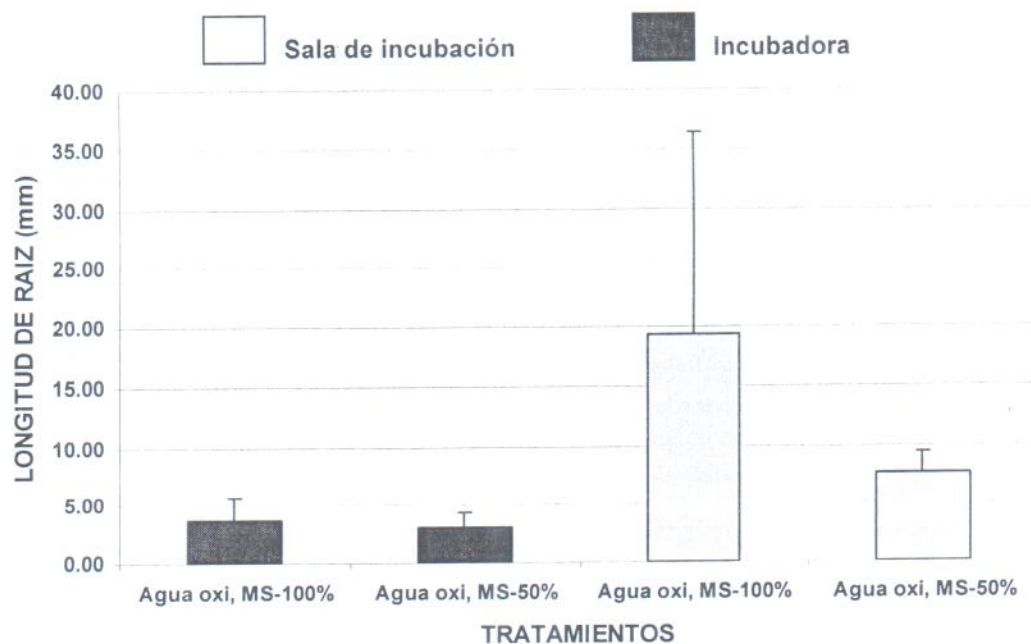


Figura 2. Longitud de raíz de semilla obtenida con 4 tratamientos de medio MS.

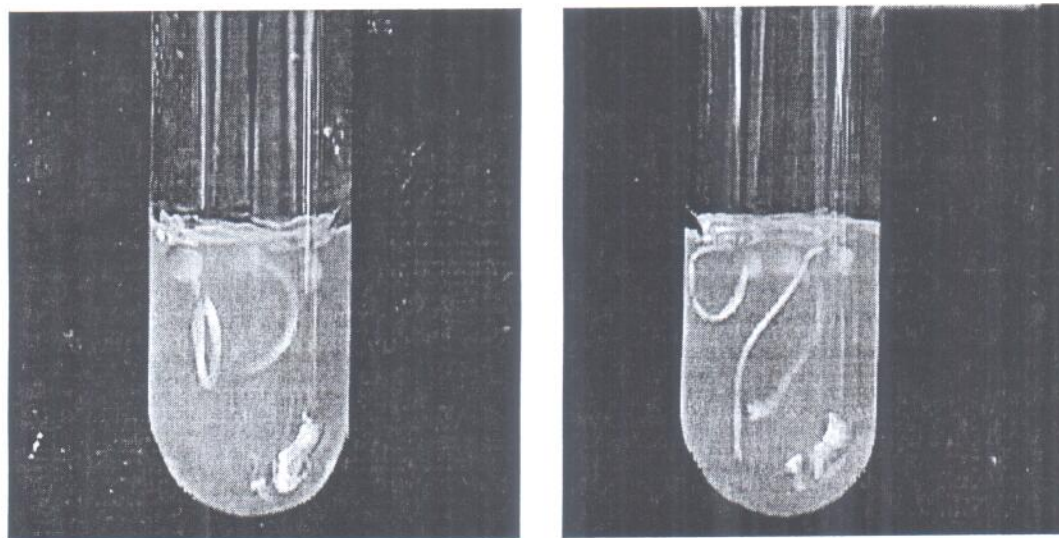


Figura 3. Germinación de semillas de *Nolina parviflora* sembradas en MS al 100% en incubadora, después de 4 semanas.

CAPÍTULO III

RESPUESTAS ORGANOGENICAS *in vitro*

DE *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl²

A. Flores-García^{3¶}; J. G. Álvarez-Moctezuma³; J. L. Rodríguez-De La O⁴;

A. Corona-Ambriz³.

³División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. C.P. 56230. Chapingo. México. Tel. (595)952-1500 ext 5468 ó 5492. Fax: (595)952-1637.

⁴Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. A.P. 37. C.P. 56230. Chapingo. México. Tel. (595)952-1500 ext 6236 ó 6325.

Correo electrónico: fogal2@yahoo.com.mx (¶responsable); jogualmo@chapingo.mx; jrguez@taurus1.chapingo.mx; ambrizcor@yahoo.com.mx

RESUMEN

Dentro de la familia Nolinaceae se encuentra el sotolín (*Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl, planta arborescente que se ubica en zonas cálidas y secas de los estados

² Flores G., A., J. G. Álvarez M., J. L. Rodríguez de la O y A. Conona A. Será sometido a la Revista Agrociencia

de Hidalgo, México, Puebla, San Luís Potosí y Veracruz. Se ha reportado un uso medicinal y de ornato para el género, además de guardar importancia por ser eslabón de materia prima que contribuye a la economía de los productores de algunas zonas áridas y semiáridas de nuestro país. La especie guardaba la incógnita de su propagación *in vitro* hasta el presente trabajo, que evaluó las respuestas organogénicas empleando auxinas y citocininas: Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido indol-butírico (AIB), Ácido naftalanacetico (ANA), Ácido indol-acético (AIA), Benziladenina (BA) y Kinetina (KIN) respectivamente a diferentes concentraciones promoviendo exitosamente la inducción de organogénesis somática de la especie a partir de segmentos de tallos de plántulas.

PALABRAS CLAVE

2,4-D, AIB, ANA, AIA, BA, KIN

SUMMARY

The *Nolina parviflora* palm (H.B.K.) Hemsl is found within the Nolinaceae family. It is an arborescent plant that is found in the warm and dry zones of the States of Hidalgo, Mexico, Puebla, San Luis Potosi and Veracruz. It has been reported to have medicinal and ornamental uses for the genus, besides being important because it is the raw material link that is an important part of the economy of the agricultural producers in some arid and semiarid zones in Mexico. *In vitro* propagation of this species was a mystery before this research evaluated its organogenic reactions using auxins and cytokinins: 2,4 diclorofenoxiacetic acid (2,4-D), indole-butyric acid (AIB), naftalanacetic acid (ANA), indole-acetic acid (AIA), benziladenina (BA) and kinetina

(KIN) respectively with different concentration levels, which successfully promoted the induction of the somatic organogenesis of the species, using stem rings from plantlets.

KEY WORDS

2,4-D, IBA, NAA, IAA, BA, KIN

INTRODUCCIÓN

La palma cortante ó sotolín (*Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl, Nolinaceae) es una planta arborescente distribuida en zonas cálidas y secas (Rzedowski, 1978) en los estados de Hidalgo, México, Puebla, San Luís Potosí y Veracruz (Reyes, 2002). Sinonimias: *Cordyline parviflora* H.B.K. y *Nolina altamiranoa* Rose. (Calderón y Rzedowski, 2001).

De 272 especies del género *Agave* y de 36 de los géneros *Dasyllirion* y *Nolina*, que se reportan para México y Centroamérica, existen 68 especies con usos medicinales, farmacológicos y etnobotánicos (Gioanetto y Franco, 2004). Por otra parte se reportan 24 especies nativas del género *Nolina* del Sur de EE.UU., México a Guatemala (López y Sánchez, 2001). Otro uso de *Nolina spp.* corresponde a un elemento principal requerido para rodillos y discos de las barredoras mecánicas empleadas en las calles (FAO, 1994). *Nolina cespitifera* es un recurso de suma importancia en la economía para los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del sur de Coahuila, sur de Nuevo León y norte de Zacatecas (Castillo *et al.*, 2004).

Por otra parte, los factores ambientales que provoca periodos prolongados de sequedad y bajas temperaturas extremas son fuentes de mortalidad en plántulas de *Nolina parviflora* incidiendo hasta un 71%. Otro aspecto importante es que entre la fase de transición entre la germinación y el establecimiento de las plántulas es el tamaño de la semilla (López, 1986).

Se han realizado estudios sobre la propagación *in vitro* de la familia Liliaceae: *Lilium bulbiferum* (Kremer *et al.*, 1995), *Trillium persistens* (Pence, *et al.*, 1995); familia Agaveceae: *Cordyline fruticosa* (Podwyszynska *et al.*, 1995), *Yucca filifera* (Quintero, 1990), *Yucca aloifolia* (Atta *et al.*, 1997), *Yucca glauca* (Bentz, 1988) *Agave sisalana* (Nikam, 1997), *Agave parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999), entre otras. Estos géneros pertenece a los órdenes Liliales y Agavales mismos en los que ha sido ubicada el género *Nolina* a través del tiempo (Matuda y Piña, 1980; Reyes, 2002; Rodríguez y Porras, 2002), no obstante no se reportan estudios de propagación *in vitro* para éste género.

Por esta razón y para esta especie en particular el objetivo de este trabajo fue probar diferentes concentraciones de auxinas y citocininas para determinar la mejor combinación que promoviera las respuestas organogénicas *in vitro*. Lo anterior da un primer estudio en la propagación de *Nolina parviflora* lo que permitirá continuar con ensayos posteriores en la técnica de cultivo de tejidos para esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo. Las

semillas de *Nolina parviflora* necesarias para la obtención del explante fueron donadas por el vivero forestal San Luís Tláhuac ubicado en la delegación Xochimilco.

Como primer paso las semillas recibieron un tratamiento de desinfección con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (3% v/v), posterior a ello se pusieron a germinar en medio básico de sales inorgánicas de MS al 100%, todo el material se colocó en incubadora por 21 días hasta la obtención de plántulas, bajo un ambiente controlado (Flores *et al.*, 2005). Sin presencia de iluminación, solo una temperatura promedio de 25° C las 24 horas del día. El explante que se empleó para la etapa de multiplicación de brotes provino de las plántulas logradas, éste fue segmentos de tallo de 0.7 a 1 cm. de longitud.

Previo a la siembra, el material empleado en el laboratorio fue esterilizado en autoclave por un tiempo de 40 minutos a una temperatura de 120° C y 1.5 kg/cm² de presión. Las semillas se sembraron en tubos de ensaye de 25 x 150 mm con 15 ml de medio de cultivo y frascos tipo gerber con 20 ml de medio de cultivo, con pH ajustado a 5.7 ± 1 . El medio de cultivo se esterilizó 20 minutos a 120° C y 1.5 kg/cm² de presión.

Multiplicación de brotes

Las citocininas utilizadas para la multiplicación de brotes fueron: Benziladenina (BA) y 6-Furfurilaminopurina ó Kinetina (KIN) en concentraciones de 0.0, 0.1 y 1.0 μM ; las auxinas utilizadas fueron: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido indolbutírico (AIB) y Ácido naftalanacético (ANA) a concentraciones 0.1 y 1.0 μM , fueron seleccionadas estas concentraciones por que en el análisis previo mostraron las mejores

respuestas. Se consideró la combinación entre auxinas y citocininas como tratamientos, cada tratamiento tenía 5 repeticiones. El medio se complementó con la solución básica del medio MS al 100% de sales inorgánicas; 3% de tiamina; 3% de inositol; 1.5% de ácido nicotínico; 3% de ácido piridoxínico; 3% de sacarosa y 7% de agar; el medio se esterilizó en autoclave por un tiempo de 20 minutos a una temperatura de 120° C y 1.5 kg/cm² de presión. El cultivo se mantuvo por 10 semanas en sala de incubación bajo iluminación por lámparas fluorescentes DURO-TEST (SlimLine) de 75 W a una temperatura de 25° C ($\pm 2^\circ$ C) y bajo una intensidad luminosa de 28.05 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

El explante empleado en esta etapa para el experimento fue el segmento basal del tallo, se seleccionó éste ya que bajo un ensayo preliminar presentó respuesta a los reguladores a diferencia de la parte media que no presentó; el experimento se planteó bajo un diseño completamente al azar, se realizó análisis de varianza con la finalidad de determinar si existía diferencia significativa entre tratamientos y la comparación de medias a través de la prueba DMS con un nivel de significancia de $\alpha=5\%$, para determinar los mejores tratamientos. Las variables evaluadas al final del periodo de incubación fueron: a) longitud de raíz (mm); b) diámetro de raíz (mm) ambas variables medidas con vernier; c) volumen de raíz (mm³) calculado mediante la formula $v=\pi\cdot\text{radio}^2\cdot\text{longitud}$; d) número de raíces; e) peso verde de raíz (mg); f) peso seco de raíz (mg); g) longitud de brote (mm); h) ancho de brote (mm); i) número de brotes; j) peso verde del brote (mg) y k) peso seco del brote (mg). Con la finalidad de relacionar e integrar la variable longitud de raíz con la variable diámetro de raíz se decidió que el

volumen era un parámetro para hacerlo, asimismo evidenciaría las tasas de crecimiento de la raíz en los diferentes tratamientos.

Enraizamiento de brotes

Para la formación de raíces en los explantes se probaron las auxinas: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); Ácido indol-butírico (AIB); Ácido naftalanacético (ANA) y Ácido indol-acético (AIA) en forma aislada, bajo las concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, 10.0, 15.0 y 20.0 μM . El medio se complementó con la solución básica del medio MS al 100% de sales inorgánicas, 3% de tiamina, 3% de inositol, 1.5% de ácido nicotínico, 3% de ácido piridixínico, 3% de sacarosa y 7% de agar; éste fue esterilizado en autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120° C y 1.5 kg/cm^2 de presión.

El diseño experimental establecido fue en bloques completamente al azar considerando a las concentraciones como bloques y a cada auxina como tratamiento. Por tratamiento se sembraron dos segmentos del mismo tallo (basal y medio), dando un total de 144 unidades experimentales. El cultivo se mantuvo por 40 días en sala de incubación bajo iluminación por lámparas fluorescentes DURO-TEST (SlimLine) de 75 W a una temperatura de 25° C ($\pm 2^\circ$ C) y bajo una intensidad luminosa de 28.05 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

En el análisis estadístico se evaluaron las variables: a) longitud de raíz (mm); b) diámetro de raíz (mm) ambas variables medidas con vernier; c) volumen de raíz (mm^3) calculado mediante la fórmula $v=\pi\cdot\text{radio}^2\cdot\text{longitud}$; d) número de raíces; e) peso verde de raíz (mg) y f) peso seco de raíz (mg). Se obtuvo el análisis de varianza para el diseño

experimental y se realizó la comparación de medias a través del método t, el cual se basa en la Diferencia Mínima Significativa (DMS), con un nivel de significancia de $\alpha=5\%$.

Formación de callo

Las concentraciones de las auxinas, el medio, las condiciones y el tiempo de cultivo fueron iguales a las probadas en el ensayo para enraizamiento, el diseño experimental fue el mismo; en este caso la respuesta a evaluar fue la formación de callo. Además, se analizaron al final del periodo de incubación las variables: a) largo (mm), b) ancho (mm) y c) alto (mm). Para determinar que tratamiento tenía mejor efecto sobre la respuesta se obtuvo el análisis de varianza y se realizó la prueba de hipótesis correspondiente, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Multiplificación de brotes

La variable longitud de raíz mostró una diferencia significativa entre tratamientos, realizando la comparación de medias se obtuvo que los tratamientos 16, 20 y 21 (1.0 μM de AIB, 0.1 μM de AIB / 0.1 μM de KIN y 0.1 μM de AIB / 1.0 μM de KIN) eran estadísticamente diferentes y superiores al resto, tal como se presenta en el cuadro 4.

La variable diámetro de raíz también mostró diferencia significativa entre tratamientos, donde de acuerdo a los resultados de la comparación de medias resultó el tratamiento 26 (1.0 μM de ANA / 0.1 μM de BA) ser superior a los demás (Cuadro 4).

Los resultados del tercer análisis de varianza realizado para la variable volumen de raíz indicaron que existía diferencia estadística entre tratamientos y de acuerdo a la comparación de medias resultó que tratamientos 26 y 29 (1.0 μM de ANA / 0.1 μM de BA y 1.0 μM de ANA / 0.1 μM de KIN) fueron superiores al resto.

Para el análisis de la variable número de raíces, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza se determinó que existía diferencia significativa entre tratamientos. Para determinar el tratamiento que era estadísticamente diferente a los demás se hizo la comparación de ellos basada en los rangos (Cuadro 4), donde el tratamiento 8 (1.0 μM de 2,4 D / 0.1 μM de KIN) resultó ser superior al resto.

En el peso verde de raíz existía diferencia significativa entre tratamientos, la prueba de DMS para la comparación de medias demostró que los tratamientos 8 y 26 (1.0 μM de 2,4 D / 0.1 μM de KIN y 1.0 μM de ANA / 0.1 μM de BA) eran estadísticamente diferentes.

Para el peso seco de raíz el análisis de varianza indicó que existía diferencia significativa entre tratamientos. La prueba de DMS para la comparación de medias demostró que el tratamiento 8 (1.0 μM de 2,4 D / 0.1 μM de KIN) era estadísticamente diferente a los demás.

La variable longitud de brote demostró diferencia significativa entre tratamientos; la prueba de DMS realizada indicó que más de un tratamiento era estadísticamente diferente al resto (Cuadro 5).

El análisis de varianza para el ancho de brote indicó que existía diferencia significativa entre tratamientos. Realizando una prueba de DMS para la comparación de tratamientos se encontró que los tratamientos 10, 11 y 24 eran estadísticamente mejores y deferentes al resto.

El número de brotes contabilizados por tratamiento fue analizado mediante el procedimiento NPARWAY1 del programa SAS, el análisis de varianza mostró que no existía diferencia significativa entre tratamientos bajo una confiabilidad del 95%.

El análisis de varianza para la variable peso verde del brote indicó que existía diferencia significativa entre tratamientos. La prueba de DMS realizada señaló que los tratamientos 4, 6, 11, 12, 26 y 27 eran estadísticamente iguales aunque mejores al resto.

La variable peso seco de brote mostró diferencia significativa según el análisis de varianza. Realizando una prueba de DMS se determinó que los tratamientos 4, 5, 7, 8, 11, 12, 25, 26, 27, 29 y 31 era estadísticamente iguales pero mejores al resto.

Enraizamiento de brotes

Sólo hubo respuesta del segmento basal del tallo. Los resultados del análisis de varianza para las variables volumen de raíz (mm^3), número de raíces, peso verde de raíz (mg) y peso seco de raíz (mg) mostraron que no existía diferencia significativa entre tratamientos, por su parte la variable longitud de raíz (mm) y diámetro de raíz (mm) presentaron diferencia significativa entre tratamientos, la prueba de DMS para la

comparación de medias mostró cuales eran los mejores tratamientos (Cuadro 6, Figuras 4 y 5).

De acuerdo a los resultados del análisis se tiene que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 4 (2,4 D y AIA respectivamente), solo los tratamientos 2 y 3 (AIB y ANA) son estadísticamente diferentes a los restantes. Para la prueba enraizamiento de brotes se determinó no emplear la auxina AIA ya que además de no ser estadísticamente significativo al tratamiento 1 tampoco se observó alguna respuesta.

Formación de callo

Los datos obtenidos en los bioensayos de las auxinas provenían de los segmentos basales y medio del tallo. El análisis de varianza para las variables largo, ancho y alto no presentaron diferencia significativa entre tratamientos, no hubo desarrollo de algún órgano como raíz ó tallo.

DISCUSIONES

Multiplicación de brotes

Al haber observado las respuestas por parte de los reguladores de crecimiento corroboramos que no sólo influyen en la respuesta de muchas partes de la planta, sino que dichas respuestas dependen de la especie, su estado de desarrollo, la concentración

hormonal, las interacciones entre los reguladores y diversos factores ambientales (Salisbury *et al.*, 2000).

Para el caso de la variable longitud de raíz se obtuvo diferencias significativas cuando se aplicó 0.1 ó 1.0 μM de KIN combinada con una concentración de 0.1 μM de AIB, en *Yucca aloifolia* se determinó que se lograba la mayor longitud de raíz cuando se aplicaba 17.8 μM de BA pero incrementaba significativamente cuando se usaba Medio MS al 50% de sales inorgánicas en ausencia de AIB (Atta *et al.*, 1997). La variable diámetro de raíz respondió de manera significativa mediante la aplicación combinada de ANA con 1.0 μM y BA con 0.1 μM . Resulta interesante que la variable volumen (producto de las variables longitud y diámetro de raíz) sólo tuvo diferencia significativa cuando se aplicó ANA a 1.0 μM en combinación con 0.1 μM de BA ó KIN. La variable número de raíces fue estadísticamente diferente a las demás cuando se aplicó 1.0 μM de 2,4 D combinada con 0.1 μM de KIN, para el caso de *Yucca aloifolia* se obtuvo el mayor número de raíces cuando se aplicó 17.8 μM de ANA (Atta *et al.*, 1997). Para el peso verde de la raíz sólo tuvo diferencia significativa cuando se combinó 1.0 μM de 2,4D ó ANA con 0.1 μM de KIN ó BA respectivamente; pero para el caso del peso seco de raíz sólo hubo respuesta con 1.0 μM de 2,4 D y 0.1 μM de KIN.

La variable longitud de brote presentó diferencia significativa entre tratamientos, observándose que las concentraciones de las auxinas y citocininas no tenían influencia sobre la respuesta, en *Yucca glauca* (Bentz *et al.*, 1988) determinó que la longitud mayor de brote disminuía con el incrementos de la concentración de BA (9.0 a 45.0 μM), en *Yucca aloifolia* la mayor longitud de brote se logró cuando se aplicó 4.4 μM -BA pero se ratificó que ésta disminuía cuando más se incrementaba la concentración de citocinina

(Atta *et al.*, 1997). El ancho de brote presentó respuesta ante 0.1 μM de BA con 1.0 μM de BA y 1.0 μM de 2,4 D con 0.1 μM de KIN. No hubo diferencia significativa entre tratamientos para la variable número de brotes, en *Yucca glauca* (Bentz *et al.*, 1988) se determinó que el mayor número de brotes ocurría ante altas concentraciones de BA (36.0 y 45.0 μM), por lo tanto para que en el presente trabajo se hubiese generado respuesta tendría que haberse aplicado concentraciones altas de BA, en *Yucca aloifolia* el mayor número de brotes se logró cuando se aplicó 17.8 μM de BA (Atta *et al.*, 1997); en *Prosopis alba* se obtuvo el mayor porcentaje de brotes cuando segmentos uninodales de tallo fueron cultivados en posición horizontal en sales MS complementadas con 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB y 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN después de 60 días de cultivo (Castillo, 2004). Para el peso verde de brote de manera general se puede decir que hubo diferencia de tratamientos cuando se aplicó 1.0 μM de 2,4 D ó ANA con 0.1 μM de BA. Para el peso seco de brote se presentó diferencia significativa cuando se combinó 0.1, 1.0 μM de 2,4 D ó ANA con 0.1, 1.0 μM de BA.

Enraizamiento de brotes

La razón por la cual solo hubo respuesta en la parte basal del tallo es por que en la mayoría de las especies el lugar donde se forman las raíces en los tallos es la posición basal opuesta (distal) al ápice del tallo (Salisbury *et al.*, 2000), hasta siete veces más hay acumulación de auxinas en la parte inferior de un tallo que en la superior (Fisher, 1975). En cuanto a las variables respuesta sólo hubo diferencia significativa para la longitud de raíz cuando se aplicó AIB y ANA y en el diámetro cuando se aplicó AIB; las diferencias

en desviación estándar fueron debidas a la variabilidad genética de las semillas que dieron origen al explante. En pruebas realizadas para enraizamiento de *Yucca glauca* fue innecesaria la aplicación de ANA ya que el 90% del enraizamiento ocurrió en medio libre de reguladores ANA (Bentz *et al.*, 1988), por otra parte en *Yucca aloifolia* hubo respuesta de enraizamiento cuando se aplicó ANA (Atta *et al.*, 1997).

Formación de callo

Hubo respuesta en la formación de callo, no obstante éste no era estadísticamente diferente entre los tratamientos 2,4-D; AIB; ANA y AIA a concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, 10.0, 15.0 y 20.0 μM ; por otra parte los callos presentaron diferenciación de algún órgano (raíz ó brote de tallo). Para el caso de otras especies de la misma familia se reporta que en *Yucca gloriosa* fue obtenido callo estrictamente en un medio MS complementado 2.65-5.29 μM de 2,4 D sin llegar a la formación de órganos (Meskhi *et al.*, 1978 cit. por Quintero, 1990), para *Yucca filifera* el mejor medio tanto para la inducción como para la propagación de callo estuvo complementado con 10 μM de ANA con 0.01 μM de BA, 10 μM de ANA con 1 nM de BA (Quintero, 1990); En *Yucca glauca* se obtuvieron brotes a partir de callo cuando el medio MS en el que se encontraba fue suplementado con 0.529 μM de 2,4 D (Stohs *et al.*, 1974 cit. por Quintero, 1990).

CONCLUSIÓN

El presente estudio mostró que es posible promover organogénesis somática de *Nolina parviflora* a través del cultivo *in vitro* de segmentos de tallo empleando auxinas 2,4-D, AIB, ANA, AIA, y las citocininas BA y KIN.

Cuadro 4. Valores promedio de longitud de raíz, diámetro de raíz y número de raíces, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas y citocininas.

Tratamiento Concentración de auxina (μM) / citocinina (μM)		Longitud de raíz (mm)		Diámetro de raíz (mm)		Número de raíces	
1.-	0.1 (2,4 D) / 0.0 (KIN)	23.81	b ^y	1.33	b ^y	4.00	c ^x
2.-	0.1 (2,4 D) / 0.1 (KIN)	13.12	c	1.31	b	2.50	e
3.-	0.1 (2,4 D) / 1.0 (KIN)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
4.-	0.1 (2,4 D) / 0.0 (BA)	14.80	c	1.00	c	3.66	d
5.-	0.1 (2,4 D) / 0.1 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
6.-	0.1 (2,4 D) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
7.-	1.0 (2,4 D) / 0.0 (KIN)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
8.-	1.0 (2,4 D) / 0.1 (KIN)	17.20	c	1.36	b	25.00	a
9.-	1.0 (2,4 D) / 1.0 (KIN)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
10.-	1.0 (2,4 D) / 0.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
11.-	1.0 (2,4 D) / 0.1 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
12.-	1.0 (2,4 D) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
13.-	1.0 (AIB) / 0.0 (BA)	51.43	c	0.65	c	1.25	k
14.-	1.0 (AIB) / 0.1 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
15.-	1.0 (AIB) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
16.-	1.0 (AIB) / 0.0 (KIN)	58.36	a	0.74	c	1.00	l
17.-	1.0 (AIB) / 0.1 (KIN)	48.87	b	0.62	c	1.00	l
18.-	1.0 (AIB) / 1.0 (KIN)	22.46	c	0.68	c	1.00	l
19.-	0.1 (AIB) / 0.0 (KIN)	22.15	c	0.56	c	1.33	j
20.-	0.1 (AIB) 0.1 (KIN)	74.67	a	0.66	c	2.00	f
21.-	0.1 (AIB) / 1.0 (KIN)	91.74	a	0.49	c	1.00	l
22.-	0.1 (AIB) / 0.0 (BA)	54.34	b	0.49	c	1.33	j
23.-	0.1 (AIB) / 0.1 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
24.-	0.1 (AIB) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
25.-	1.0 (ANA) / 0.0 (BA)	8.60	c	1.39	b	1.25	k
26.-	1.0 (ANA) / 0.1 (BA)	11.10	c	2.37	a	9.66	b
27.-	1.0 (ANA) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
28.-	1.0 (ANA) / 0.0 (KIN)	22.82	c	1.51	b	1.00	l
29.-	1.0 (ANA) / 0.1 (KIN)	39.83	b	1.71	b	1.00	l
30.-	1.0 (ANA) / 1.0 (KIN)	4.84	c	1.63	b	1.00	l
31.-	0.1 (ANA) / 0.0 (KIN)	55.54	b	0.81	c	1.50	h
32.-	0.1 (ANA) / 0.1 (KIN)	26.40	b	0.87	c	1.75	g
33.-	0.1 (ANA) / 1.0 (KIN)	12.65	c	0.87	c	1.40	i
34.-	0.1 (ANA) / 0.0 (BA)	26.60	b	0.89	c	2.00	f
35.-	0.1 (ANA) / 0.1 (BA)	6.21	c	0.80	c	1.00	l
36.-	0.1 (ANA) / 1.0 (BA)	0.00	d	0.00	d	0.00	m
37.-	Testigo	33.49	b	0.53	c	1.00	l

^yValores con letras iguales dentro de cada columna implica que no existe diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a la prueba de DMS con un $\alpha=0.05$.

^xValores con letras iguales dentro de cada columna implica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, (Chi-S=36.1887, $\alpha=0.05$).

Cuadro 5. Valores promedio de longitud de brote y ancho de brote, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas y citocininas.

Tratamiento Concentración de auxina (μ M)/ citocinina (μ M)	Longitud de brote (mm)	Ancho de brote (mm)
1.- 0.1 (2,4 D) / 0.0 (KIN)	177.00 a ^w	0.93 b ^w
2.- 0.1 (2,4 D) / 0.1 (KIN)	128.30 b	0.53 c
3.- 0.1 (2,4 D) / 1.0 (KIN)	0.00 d	0.00 d
4.- 0.1 (2,4 D) / 0.0 (BA)	121.40 b	0.82 b
5.- 0.1 (2,4 D) / 0.1 (BA)	80.20 b	0.92 b
6.- 0.1 (2,4 D) / 1.0 (BA)	22.67 c	0.96 b
7.- 1.0 (2,4 D) / 0.0 (KIN)	87.33 b	0.98 b
8.- 1.0 (2,4 D) / 0.1 (KIN)	116.75 b	0.94 b
9.- 1.0 (2,4 D) / 1.0 (KIN)	90.20 b	0.65 c
10.- 1.0 (2,4 D) / 0.0 (BA)	92.20 b	1.14 a
11.- 1.0 (2,4 D) / 0.1 (BA)	108.00 b	1.47 a
12.- 1.0 (2,4 D) / 1.0 (BA)	18.67 c	0.74 b
13.- 1.0 (AIB) / 0.0 (BA)	180.40 a	0.51 c
14.- 1.0 (AIB) / 0.1 (BA)	93.00 b	0.44 c
15.- 1.0 (AIB) / 1.0 (BA)	43.80 b	0.79 b
16.- 1.0 (AIB) / 0.0 (KIN)	182.80 a	0.51 c
17.- 1.0 (AIB) / 0.1 (KIN)	162.25 a	0.48 c
18.- 1.0 (AIB) / 1.0 (KIN)	120.40 b	0.54 C
19.- 0.1 (AIB) / 0.0 (KIN)	174.60 a	0.53 C
20.- 0.1 (AIB) / 0.1 (KIN)	191.00 a	0.55 c
21.- 0.1 (AIB) / 1.0 (KIN)	132.80 b	0.49 c
22.- 0.1 (AIB) / 0.0 (BA)	242.33 a	0.58 c
23.- 0.1 (AIB) / 0.1 (BA)	215.80 a	0.52 c
24.- 0.1 (AIB) / 1.0 (BA)	50.33 b	1.25 a
25.- 1.0 (ANA) / 0.0 (BA)	251.80 a	0.64 c
26.- 1.0 (ANA) / 0.1 (BA)	109.00 b	0.86 b
27.- 1.0 (ANA) / 1.0 (BA)	32.20 c	0.73 b
28.- 1.0 (ANA) / 0.0 (KIN)	190.20 a	0.73 b
29.- 1.0 (ANA) / 0.1 (KIN)	215.60 a	0.71 b
30.- 1.0 (ANA) / 1.0 (KIN)	87.00 b	0.76 b
31.- 0.1 (ANA) / 0.0 (KIN)	201.00 a	0.56 c
32.- 0.1 (ANA) / 0.1 (KIN)	214.25 a	0.62 c
33.- 0.1 (ANA) / 1.0 (KIN)	159.00 a	0.51 c
34.- 0.1 (ANA) / 0.0 (BA)	197.40 a	0.56 c
35.- 0.1 (ANA) / 0.1 (BA)	129.25 b	0.58 c
36.- 0.1 (ANA) / 1.0 (BA)	34.25 c	1.08 b
37.- Testigo	118.60 b	0.39 c

^wValores con letras iguales dentro de cada columna implica que no existe diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a la prueba de DMS, con $\alpha=0.05$.

Cuadro 6. Valores promedio de longitud y diámetro de raíz del segmento basal del tallo, obtenidos como respuesta de la aplicación de auxinas.

Tratamiento	Longitud de raíz (mm)	Diámetro de raíz (mm)
1.- 2,4-D	1.1739 b ^z	0.1372 b
2.- AIB	3.1622 a	0.4889 a
3.- ANA	2.2744 a	0.1611 b
4.- AIA	0.0000 b	0.0000 b

^zValores con letras iguales dentro de cada columna implica que no existe diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a la prueba de DMS con un $\alpha=0.05$.

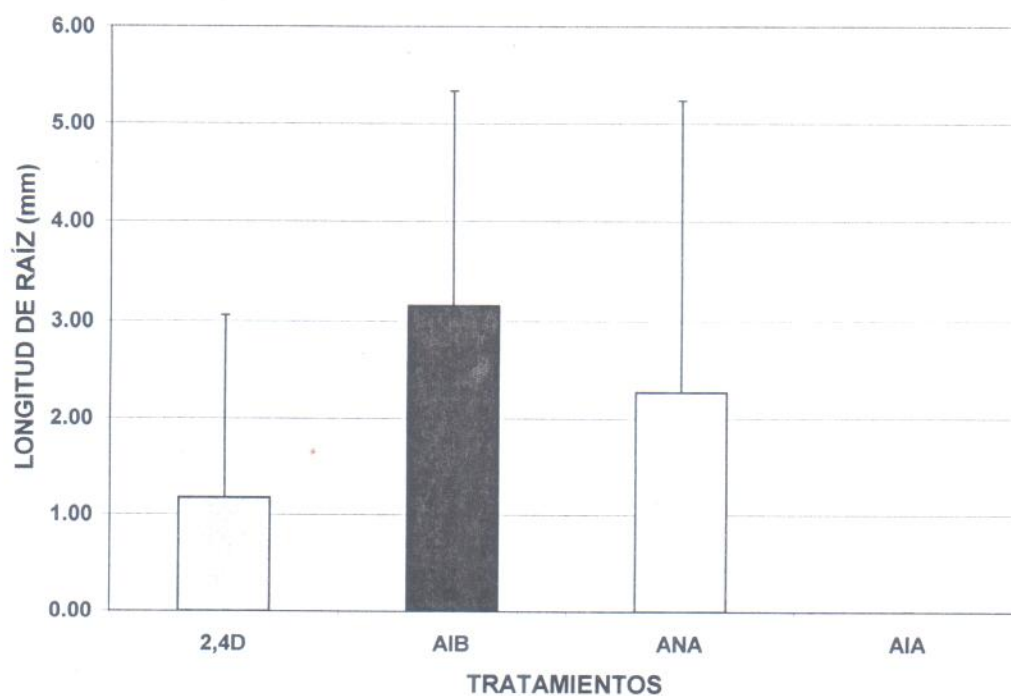


Figura 4. Longitudes promedio de raíz (mm) del segmento basal de tallos obtenidos en cuatro tratamientos de auxina.

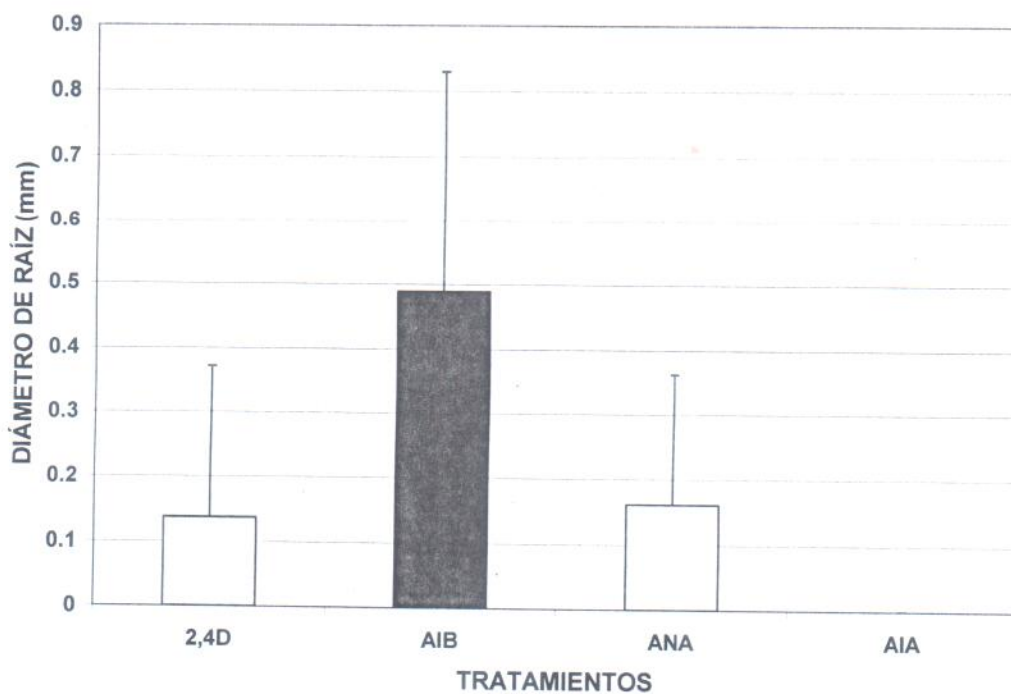


Figura 5. Diámetros promedio de raíz (mm) del segmento basal de tallos obtenidos en cuatro tratamientos de auxina.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

Establecimiento

En la presente investigación el mejor tratamiento de desinfección de semilla fue aquel que la sumergió semilla en peróxido de hidrogeno (3%) y estuvo en agitación durante 24 horas. Existen algunas especies forestales donde este tratamiento ha sido eficaz como *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* en donde se sumergió en Peróxido de Hidrógeno (3%) por 5 horas (Dumroese, *et al.*, 1988); *Pinus ponderosa* redujo significativamente los niveles de *Fusarium* (James y Genz, 1981).

Además de la efectiva capacidad de esterilización en semillas forestales el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) ha demostrado incrementar la germinación en algunas semillas de pino; porque ablanda su testa e incrementa la permeabilidad del agua y oxígeno (Barnett, 1998). Un factor importante cuando se aplica H_2O_2 es la agitación de la semilla puesto que se minimiza la demanda química del oxígeno (Rodríguez, *et al.*, 2004), la velocidad de agitación es importante pues asegura un suministro adecuado del oxígeno (Sánchez, 2004). Cuando se hace la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por bacterias (Riofrio, 2004).

La germinación que se obtuvo fue de un 55% bajo las condiciones preestablecidas. Para esta especie si las semillas se remojan en agua por 24 horas y se colocan a un temperaturas de 20° y 25° C se obtendrá germinaciones del 87.5% y 85% respectivamente, ambos casos en ausencia de luz (Reyes, 2002). En *Nolina recurvata* ocurrió cuando la semilla estuvo a una temperatura de 20° C (Faucon, 2004); en caso de que las semillas fueran previamente sumergidas en agua caliente por cuatro horas y colocadas a 26° C se obtuvo un 80% de germinación en el primer mes (Mário, 2003).

Multiplicación de brotes

Para el caso de la variable longitud de raíz se obtuvo diferencias significativas cuando se aplicó 0.1 ó 1.0 μM de KIN combinada con una concentración de 0.1 μM de AIB, en *Yucca aloifolia* se determinó que se lograba la mayor longitud de raíz cuando se aplicaba 17.8 μM de BA (Atta *et al.*, 1997). La variable diámetro de raíz tuvo respuesta significativa mediante la aplicación combinada de ANA con 1.0 μM y BA con 0.1 μM . El volumen de raíz tuvo diferencia significativa cuando se aplicó ANA a 1.0 μM en combinación con 0.1 μM de BA ó KIN. La variable número de raíces fue estadísticamente diferente a las demás cuando se aplicó 1.0 μM de 2,4 D combinada con 0.1 μM de KIN, para el caso de *Yucca aloifolia* se obtuvo el mayor número de raíces cuando se aplicó 17.8 μM de ANA (Atta *et al.*, 1997). Para el peso verde de la raíz tuvo diferencia significativa cuando se combinó 1.0 μM de 2,4D ó ANA con 0.1 μM de KIN ó BA respectivamente; pero para el caso del peso seco de raíz sólo hubo respuesta con 1.0 μM de 2,4 D y 0.1 μM de KIN.

Para el caso de la variable longitud de brote presentó diferencia significativa entre tratamientos, en *Yucca aloifolia* la mayor longitud de brote se logró cuando se aplicó 4.4 μM -BA pero se ratificó que ésta disminuía cuando más se incrementaba la concentración de citocinina (Atta *et al.*, 1997). El ancho de brote presentó respuesta ante 0.1 μM de BA con 1.0 μM de BA y 1.0 μM de 2,4 D con 0.1 μM de KIN. No hubo diferencia significativa entre tratamientos para la variable número de brotes, en *Yucca aloifolia* el mayor número de brotes se logró cuando se aplicó 17.8 μM de BA (Atta *et al.*, 1997). Para el peso verde de brote de manera general se puede decir que hubo diferencia de tratamientos cuando se aplicó 1.0 μM de 2,4 D ó ANA con 0.1 μM de BA. Para el peso seco de brote se presentó diferencia significativa cuando se combinó 0.1, 1.0 μM de 2,4 D ó ANA con 0.1, 1.0 μM de BA.

Enraizamiento de brotes

En cuanto a las variables respuesta sólo hubo diferencia significativa para la longitud de raíz cuando se aplicó AIB y ANA y en el diámetro cuando se aplicó AIB. En pruebas realizadas para enraizamiento de *Yucca aloifolia* hubo respuesta de enraizamiento cuando se aplicó ANA (Atta *et al.*, 1997).

Formación de callo

El callo que se formó no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos 2,4-D; AIB; ANA y AIA a concentraciones de 0.0, 0.1, 1.0, 10.0, 15.0 y 20.0 μM ; por otra

parte los callos presentaron diferenciación de algún órgano (raíz ó brote de tallo). En *Yucca gloriosa* se reporta que obtenido callo estrictamente en un medio MS complementado 2.65-5.29 μM de 2,4 D sin llegar a la formación de órganos (Meskhi *et al.*, 1978 cit. por Quintero, 1990), para *Yucca filifera* el mejor medio tanto para la inducción como para la propagación de callo fueron 10 μM de ANA con 0.01 μM de BA, 10 μM de ANA con 1 nM de BA (Quintero, 1990).

CONCLUSIÓN GENERAL

Al concluir la presente investigación se determinó que el mejor tratamiento para realizar la desinfección de semilla de *Nolina parviflora* consiste en sumergir la semilla en Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y mantenerla en agitación por 24 horas. Asimismo, es posible promover organogénesis somática de la especie a través del cultivo *in vitro* de segmentos de tallo empleando auxinas 2,4-D, AIB, ANA, AIA, y las citocininas BA y KIN.

LITERATURA CITADA

- ASTRE (Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Atlanta). 2004. Peroxido de hidrogeno. Atlanta, GA. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts174.html
- Atta A., H. and J. Van S. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) 48:209-212.
- Barnett J., P. 1998. Desinfecting seeds with hydrogen peroxide. <http://www.sfws.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 3 pp.
- Bentz, S. E., B. J. Parlman, H. J. Talbott, W. L. Ackerman. 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Yucca glauca*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) 14:111-120.
- Bonnet, J. 2004. Esterilización y desinfección. Apuntes universitarios. España. 5 pp. <http://html.rincondelvago.com/esterilización-y-desinfeccion.html>
- Calderón de R., G. y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2 ed. Jalapa, Méx., Instituto de Ecología, A.C. p. 1239-1242.
- Castillo de M., G. y A. Barceló M. 2004. Cultivo horizontal de segmentos uninodales de plantas de *Prosopis alba* Griseb. (Leguminosae). Misiones, Arg. <http://www.facfor.unam.edu.ar/silvman/cultivocastillo.pdf>

- Castillo Q., D., O. U. Martínez B., A. Cano P. y C. Berlanga R. 2004. "*Nolina cespitifera* Trel. recurso forestal no maderable de importancia económica en el estado de Coahuila". In: Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Mérida, Yucatán. 2004. <http://www.cicy.mx/eventos/agaves/resumen.pdf>. p. 15.
- Castro de E., M. L. 1992. Uso del cloro para la desinfección de agua para consumo: efectos en la salud humana. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/proyecto/repidisc/publica/hdt/hdt049.html>
- Dumroese R., K., R. L. JAMES, D. L. Wenny and C. J. Gilligan. 1988. Douglas-fir seed treatments: Effects on seed germination and seedborne organisms. In: Proceedings: Combined Meeting of the Western Forest Nursey Council, Intermountain Nursery Association and Forest Association of British Columbia. P. 155-160. <http://www.google.com.mx/search?q=cache:2ijp9n-hLBsJ:mgr.net/Nurseries/Publications/Proceedings/1988/dumroese.pdf>
- EPA (Environmental Protection Agency, EE.UU.). 1999. Desinfección con cloro. Washington, D.C. U. S. 9 pp. <http://www.epa.gov/own/mtb/cs-99-062.pdf>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma). 1994. "Principales productos forestales no madereros". In: Consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y el Caribe. Memoria. Santiago, Chile. 1994. Dirección de Productos Forestales, FAO, Roma. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/docrep/t2354s/t2354s00.htm#Contents>

- Faucon, P. 2004. Ponytail Palm (*Beaucarnea recurvata*). http://www.desert-tropicals.com/Plants/Agavaceae/Beaucarnea_recurvata.html
- Fisher, J. B. 1975. Eccentric secondary growth in Cordyline and other Agavaceae (Monocotyledonae) and its correlation with auxin distribution. *American Journal of Botany*. 62:292-302.
- Flores, G. A., J. G. Álvarez M., J. L. Rodríguez de la O y A. Corona A. 2005. Germinación *in vitro* de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. En prensa.
- FWS (Fish and Wildlife Service, EE.UU.). 2004. *Nolina interrata*: Dehesa Beargrass. California, USA. <http://international.fws.gov/animals/nolina.html>
- Gioanetto, F. y E. Franco J. 2004. "Usos medicinales y etnobotánicos de las Agavaceae y Nolinaceae en México y Centroamérica". In: Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Mérida, Yucatán. 2004. <http://www.cicy.mx/eventos/agaves/resumen.pdf>. pp 6-7.
- Glavin, F. 2005. *Yucca rostrata*. In: rarepalms.com. <http://www.rarepalmseeds.com/pix/YucRos.shtml>
- Hernández X., E. 1987. Experiencia mexicana en zonas áridas. In: Xolocotzia: Obras de Efraín Hernández Xolocotzi. Tomo II. Universidad Autónoma Chapingo. Revista de Geografía Agrícola. México, D.F. pp 551-563.
- HRM (Hospital Ramos Mejía, Argentina) 1993. Esterilización, Desinfección, Antisépticos y Desinfectantes. <http://www.ramosmejia.org.ar/s/inf/recomend/desinf.htm>

- INFOJARDIN. 2004. Captus y Crasas: Luz y Temperatura.
http://www.infojardin.com/suculentas/luz_y_temperatura.htm
- Iáñez P., E. 1998. Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corriente República, Arg. http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15_micro.htm
- James R., L. y D. Genz. 1981. Ponderosa pine seed treatments: effects on seed germination and disease incidence. USDA Forest Service, Missoula, MT., Northern Region Report 81-16, 13 p.
- Kremer, R., M. S. Lopes, A. DA Camara M., H. Katinger and L. Da Camara M. 1995. *In vitro* regeneration of endangered alpine flowers. *Lilium bulbiferum* spp. *bulbiferum*. Institute of Applied Microbiology, University of Agriculture, Viena, Austria. <http://www.boku.ac.at/aim/poster/alpin.htm>
- LENNTECH. 2003. Peróxido de Hidrógeno. Lenntech Agua residual & purificación del aire. México. <http://www.lenntech.com/espanol/peroxido-de-hidrogeno.htm>
- López L., A. y J. M. Sánchez De L. C. 2001. Árboles de España; manual de identificación. 2 ed. Ediciones Mundi-Prensa.
- López M., L. 1986. Esfuerzo reproductivo y sobrevivencia de *Nolina parviflora* (Liliaceae) en la zona semiárida Poblano-Veracruzana. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx. 89 p.
- Mário, P. 2003. *Beaucarnea recurvata*. In: rarepalms.com. <http://www.rarepalms.com/pix/BeaRec.shtml>

- Martínez P., A., P. Ortega L., M. Chávez V. and R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Netherlands) 74: 135-142.
- Mateos, P. F. 2004. Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca, Esp. <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion.htm#ancho141391>
- Matuda, E. e I. Piña L. 1980. Las plantas mexicanas del género *Yucca*. Serie Fernando Alva Ixtlilxochitl. Colección Miscelanea Edo. de México. Toluca, Edo. de México. 153 p.
- Miche, L. and J. Balandreau. 2001. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* . 67: 3046-3052.
- Mohan, J. S. 1999. Somatic embryogenesis in forest trees. <http://iufro.boku.ac.at/iufro/spdc/proceedings/1998/theme3.pdf>
- Niella, F. y P. Rocha. 2004. Factores que afectan la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus tadea* L. vía organogénesis. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina. 5 p. <http://factor.unam.edu.ar/silvman/organiella.pdf>
- Nikam, T. D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Netherlands) 51:225-228.

- Pence, V. and V. C. Soukup. 1995. Propagation of the rare *Trillium persistens* *in vitro*. In: Botanic Gardens Micropropagation News on the Internet. v. 1, pt 8. <http://www.rbgekew.org.uk/science/micropropagation/bgm84.html>
- Pierik R., L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Eyerbe Mateo Sagasti. Madrid, Esp., Mundi-Prensa. 325 p.
- Podwyszynska, M. and T. Olszewski. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, Cordyline and Homalomena. *Scientia Horticulturae*. 64:77-84.
- Purohit V., K., S. Tamta, S. Chandra, P. Vyas, L. M. S. Palni. and S. K. Nandi. 2002. *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Netherlands) 69: 121-133.
- Quintero, A. 1990. *Yucca*. In: Handbook of plant cell culture, ornamental species. McGraw. p. 783-799.
- Reyes B., Z. 2002. Ecología de la semilla de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. (Nolinaceae). Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Edo de Méx. 52 p.
- Riofrio, M. 2004. Growing Peppers in the Home Garden. www.g6csy.net/chile/growing.html
- Rodríguez C., B. y M. C. Porras M. 2002. Botánica Sistemática. 1ª reimpr. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx. pp 297 - 300.

- Rodríguez M., S., O. García R. y R. Muñoz M. 2004. Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de *Moringa* Lam, tropicalizada en Cuba. <http://www.monografias.com/trabajos15/bioinsecticida/bioinsecticida.shtml>
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. D.F. 432 p.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross. 2000. Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Internacional Thomson Editores. Spain Paraninfo. S. A. Madrid, España. Vol. 3. 527-988 p.
- Sánchez Y., J. M. 2004. Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*; Minirevisión. <http://monografias.com/trabajos15/bioinsecticida/bioinsecticida.shtml>
- Santacruz R., F., H. Gutiérrez P. and B. Rodríguez G. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) 56: 163-167.
- Shimasaki, K.; and Y. Fukumoto. 2000. "In vitro bulbing in *Lilium* x *Formolugi* hort seedlings". In: XXV International Horticultural Congress. Acta Horticulturae 520. Ed. by L. H. W. Derplas and G.-J. De Klerk. Brussels, Belgium. pp 61-65.
- Slack, G. 2003. Growing *Tillandsia* seed using artificial media and sterile techniques. <http://fcbs.org/articles/slack.htm>
- Tang, W. and F. Ouyang. 1999. Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) 58: 223-226.

- UCh (Universidad de Chile, Chile). 2004. Desinfectantes y antisépticos. Central de Apuntes 5. Universidad de Chile. <http://www.quirofanoweb.netfirms.com/desinfectantes.htm>
- UF (University of Florida). 2005. *Yucca glauca*. In: Enviromental Horticultura. Gainesville, FL. <http://hor.ifas.ufl.edu/lppi/htm/sp405.htm>
- USDA Forest Service (United Stated Departament of Agricultura). 2004. Botanical and Ecological Characteristics. *Yucca glauca*. Washington, D.C. http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/yucgla/botanical_and_ecological_characteristics.html
- Venegas P., E., A. Cruz H., M. E. Valverde and O. Paredes L. 2002. Plant regeneration via organogenesis in marigold. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) 69: 279-283.