



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



INSTITUTO DE HORTICULTURA

**OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA
CRASULÁCEA ORNAMENTAL *Pachyphytum*
compactum Rose PARA SU RESCATE Y
CONSERVACIÓN**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA

JULIETA RODRÍGUEZ LICONA

Chapingo, México. Junio de 2012

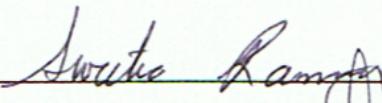


APROBACIÓN

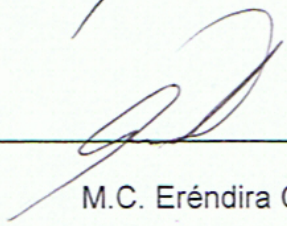
OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE LA CRASULÁCEA ORNAMENTAL *Pachyphytum compactum* Rose PARA SU RESCATE Y CONSERVACIÓN

Tesis realizada por **Julieta Rodríguez Licona**, bajo la dirección de la Dra.
Sweetia Paulina Ramírez Ramírez y del Comité Asesor indicado, aprobada
por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 
Dra. Sweetia Paulina Ramírez Ramírez

ASESOR: 
Dr. José Luis Rodríguez De la O

ASESOR: 
M.C. Eréndira Carmona Chit

ASESOR: 
M.C. Alejandro Corona Ambríz

Chapingo, Estado de México, Junio de 2012.

DEDICATORIA

A mis papás, Ma. Teresa Licona y Anibal Rodríguez,
por su amor, por su infinito apoyo, por enseñarme lo bello del conocimiento, y
por ser el ejemplo en mi vida.

A mis hermanas Fabiola y Diana,
por siempre apoyarme, aconsejarme y tener las palabras precisas en el
momento que lo he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para llevar a cabo mi maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme llevar a cabo mi maestría en Ciencias y desarrollar mi investigación.

A la Doctora Sweetia P. Ramírez Ramírez por todo su apoyo y confianza en la elaboración en este trabajo, por sus importantes aportaciones, por sus enseñanzas y por siempre creer en mí.

Al Doctor José Luis Rodríguez de la O, por su gran apoyo en el uso del laboratorio de Cultivo de tejidos, por los conocimientos que aprendí con él y por sus importantes aportaciones a esta investigación.

A la maestra Erendira Chit Carmona por sus importantes aportaciones en mi investigación, su paciencia y disposición.

Al maestro Alejandro Corona Ambríz, por su importante dirección en la parte estadística de este trabajo. Muchas gracias.

A Viridiana, porque siempre ha sido un ejemplo profesional para mí, por su paciencia conmigo, sus consejos, su apoyo incondicional, por creer en mí y por estar ahí siempre.

A Efraín, por todo su apoyo, por estar siempre conmigo aun en las peores tormentas, por siempre creer en mí, por todo lo vivido y compartido, por su confianza y porque este camino no hubiera sido el mismo sin él.

A mi familia acuática: Karlita, Carlos, Obed, Martha, Citla, Gabi, Xabe, Sofi, Dani, Paco; por siempre contar con su apoyo incondicional y animarme siempre, desde antes del inicio. Y gracias al profe Martín por todos los buenos entrenamientos y enseñarme la disciplina del deporte.

A mis grandes acompañantes y amigos del laboratorio: Erika, Marco, Clau Pau, Gabriel, Alfredo y Anaí, por todos los momentos vividos y todo lo que me enseñaron.

A Kuko, José, Lula, Rodrigo, Misael y a todos mis amigos, familia y seres queridos que siempre han tenido consejos, palabras de aliento y que han creído en mí a lo largo de los años. Gracias miles.

Hay dos cosas que me hacen inmensamente feliz en la vida:
Nadar y ver crecer crasuláceas

DATOS BIOGRÁFICOS

La ingeniera Julieta Rodríguez Licona, nació en la ciudad de Texcoco, el veinte y siete de Agosto de 1983. Ingresó al Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo en el año 2001 y graduándose en el año 2005. En el año 2007 obtuvo su título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia con la tesis: “ Propagación convencional y cultivo de 26 especies de la familia Crassulaceae con potencial ornamental ”. Durante ese mismo año y hasta el 2009 trabajó freelance en diseño de paisaje en residencias privadas en el Distrito Federal; así como en la propagación y venta de crasuláceas. En enero de 2010 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo donde realizó la Maestría en Ciencias en Horticultura, en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia.

CONTENIDO

Página

CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.OBJETIVOS.....	4
3.HIPÓTESIS.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. La familia Crassulaceae.....	5
4.1.1. Descripción botánica.....	5
4.1.2. Taxonomía de la familia Crassulaceae.....	7
4.1.3. Distribución.....	9
4.1.4. Importancia.....	11
4.1.5. Propagación convencional.....	13
4.1.6. Anatomía de la hoja.....	14
4.2. Descripción de <i>Pachyphytum compactum</i> Rose.....	16
4.2.1. La propagación de <i>Pachyphytum compactum</i>	18
4.3. La micropropagación.....	20
4.3.1. Antecedentes de la micropropagación.....	20
4.3.2. La micropropagación en el rescate de especies con problemas de reproducción convencional.....	24
4.3.3. La micropropagación en especies suculentas.....	25

4.3.4. La micropropagación en crasuláceas.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Ubicación del experimento.....	29
5.2. Obtención material vegetal.....	29
5.3. Preparación del material vegetal y establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	29
5.3.1. Selección de explantes.....	29
5.3.2. Desinfestación del material vegetal.....	30
5.3.3. Control del necrosamiento.....	31
5.3.4. Selección de reguladores de crecimiento.....	31
5.3.5. Siembra.....	32
5.4. Diseño experimental.....	33
5.4.1. Variables respuesta.....	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1. Selección de explante.....	36
6.2. Desinfestación del material vegetal.....	38
6.3. Control del necrosamiento.....	39
6.4. Selección de reguladores de crecimiento.....	44
6.5. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes.....-	43
6.5.1. Regeneración de brotes foliares.....	43
6.5.2. Regeneración de raíces.....	51
6.6. Efectos del carbón activado.....	62
6.7. Tiempo de regeneración a plantas completas.....	63
7. CONCLUSIONES.....	65

8. LITERATURA CITADA.....	68
APÉNDICE.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Inflorescencia de <i>Sedum acre</i>	6
Figura 2. Apéndices glandulares del género <i>Sedum</i>	7
Figura 3. Subfamilias de la familia Crassulaceae y su localización.....	8
Figura 4. Subfamilias y géneros mexicanos de la familia Crassulaceae.....	9
Figura 5. Estados de la República mexicana con mayor diversidad de crasuláceas.....	10
Figura 6. Células meristemáticas de <i>Kalanchoe rotundifolia</i>	15
Figura 7. Diagrama de los patrones de venación de <i>Crassula argentea</i>	15
Figura 5. Subfamilias de la familia Crassulaceae.....	16
Figura 6. Subfamilias mexicanos de la familia Crassulaceae.....	17
Figura 8. Arquitectura e inflorescencia de <i>P. compactum</i>	18
Figura 9. Localidad tipo de <i>P.compactum</i> en Querétaro e Hidalgo.....	19
Figura 10. Corte de partes basales y apicales de la hoja como explantes...	37
Figura 11. Contaminación fungosa.....	39
Figura 12. Explantes verdes y necrosados.....	40
Figura 13. Iniciación de brotes foliares.....	46
Figura 14. Desarrollo de brotes en explantes basales.....	50
Figura 15. Desarrollo de brotes en explantes basales.....	50
Figura 16. Días a emisión de raíz.....	52
Figura 17. Días a emisión de raíz por tipo de explante.....	53
Figura 18. Número de raíces por tratamiento.....	55
Figura 19. Número de raíces por tratamiento.....	56

Figura 20. Longitud de raíces.....	57
Figura 21. Longitud de raíces por tipo de explante.....	58
Figura 22. Desarrollo radicular en explantes.....	61
Figura 23. Plántula regenerada a partir de un explante de hoja.....	64
Figura 24. Inicio de aclimatación de plántulas regeneradas.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Porcentaje de necrosamiento en explantes de hoja de <i>P. compactum</i>	41
Cuadro 2. Porcentaje de explantes verdes, con respuesta e hiperhidratados.....	42
Cuadro 3. Tratamientos evaluados.....	43
Cuadro 1. del apéndice.....	77

Obtención y Propagación *in vitro* de la crasulácea ornamental *Pachyphytum compactum* Rose para su rescate y conservación

J. Rodríguez-Licon; S. P. Ramírez-Ramírez; J. L. Rodríguez-De la O;
Carmona-Chit E.; A. Corona-Ambríz

RESUMEN

Se establecieron las condiciones *in vitro* de *Pachyphytum compactum* con el fin de encontrar un método de multiplicación masiva y libre de patógenos, para su conservación y uso comercial. Los explantes utilizados fueron: parte basal y apical de hoja. La desinfección fue con alcohol al 70% y 10% de hipoclorito de sodio. Los explantes fueron cultivados en medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100 %, adicionado con Thidiazuron (0.0, 2.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Benziladenina 0.0, 0.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y sulfato de adenina (0.0, 80, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La emisión de brotes foliares se logró en medio simple para ambos explantes con un crecimiento máximo de 547.33 mm^3 . La regeneración de raíces para explantes basales, 13 como máximo se obtuvo con las concentraciones de 2.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, 0.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Sulfato de adenina; en los explantes apicales la emisión de raíces fue de 2 como máximo en todos los tratamientos, requiriéndose de mayor investigación.

Palabras clave: ornato, protocolo, suculenta, organogénesis.

Obtainment and *in vitro* Propagation of the ornamental stonecrop *Pachyphytum compactum* Rose for its rescue and conservation

J. Rodríguez-Licona; S. P. Ramírez-Ramírez; J. L. Rodríguez-De la O; E. Chit-Carmona; A. Corona-Ambríz

SUMMARY

In order to find a method of massive and pathogen-free multiplication for its conservation and commercial use, *in vitro* conditions were established for the succulent ornamental plant *Pachyphytum compactum*. Sections of the base and the tip of the leaf were used as explants. Sterilization of the plants was carried out with 70% alcohol and 10% sodium hypochlorite. These explants were grown on MS (Murashige & Skoog, 1962) media supplemented with thidiazuron (0.0, 2.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$), benziladenine 0.0, 0.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and adenine sulfate (0.0, 80, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Regeneration of shoots for both explants was obtained with simple media, with a maximum growth of 547.33 mm^3 . Regeneration of roots in base explants, 13 as maximum, was possible with 2.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, 0.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ADS; in apical explants root production was 2 as maximum in all treatments, more research is needed in the case of root regeneration.

Key words: ornamental, protocol, succulent, organogenesis

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial México ocupa el cuarto lugar por su biodiversidad, documentándose 108 519 especies de las cuales dos terceras partes corresponden a animales y la fracción restante a plantas y hongos, calculándose que hay entre 25 y 30 mil especies vegetales (SEMARNAT, 2010). Se tienen dentro de la Norma Oficial Mexicana de la Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestre (SEMARNAT-2010), 1023 especies vegetales de diversas familias botánicas catalogadas como: 1) Probablemente extinta en el medio silvestre, 2) En peligro de extinción, 3) Amenazadas y 4) Sujetas a protección especial; con el objetivo de salvaguardar estas especies de su desaparición; en dicha Norma, la familia Crassulaceae cuenta sólo con 18 especies catalogadas y protegidas entre las que se destacan *Echeveria elegans*, *Echeveria laui* y *Echeveria setosa*. A pesar de que muchos otros ejemplares de esta misma familia poseen una distribución limitada, sufren de saqueo y destrucción de su hábitat no se les ha incluido en la norma ecológica, debido a las pocas revisiones de esta.

En cuanto a su uso, las crasuláceas se han utilizado como medicinales, como es el caso de *Sedum prealtum*, pero su mayor uso ha sido como ornamentales, siendo muy atractivas por la arquitectura de sus hojas. Actualmente, se les ha dado mayor importancia en el campo de la naturación urbana, ya que su resistencia a condiciones ambientales extremas, sus requerimientos hídricos mínimos y la poca profundidad de suelo que requieren

para crecer; las hacen ideales para su uso en techos verdes, paredes vivas y camellones de zonas urbanas. Se sabe empíricamente que la mayoría de ellas, han sido extraídas de su ambiente natural, ya sea para su venta como ornamentales o como adornos navideños, siendo este último uso uno de las causas que mas afectado la desaparición de poblaciones naturales, ya que se recolectan en época navideña para adorno en nacimientos, pero las crasuláceas no logran reproducirse para la siguiente temporada (J. Reyes, 2012, com. personal¹).

El género *Pachyphytum* es de la familia Crassulaceae totalmente endémico de México y cuenta con ejemplares que son sumamente atractivos, haciéndolos una excelente opción como plantas ornamentales. Además de esta cualidad, también son especies de gran resistencia a los ambientes hostiles, como son: altas y bajas temperaturas, sequía y suelos pobres, por lo que las hace versátiles para su uso en la naturación urbana. Desafortunadamente, las especies de este género son de muy lento crecimiento, su propagación es cruzada necesitando dos ejemplares distintos genotípicamente para lograr semillas viables, dificultando la propagación sexual; de forma vegetativa, se requieren de temperaturas arriba de los 30 °C constantes para que los esquejes de hoja prosperen uniformemente. Debido a esto, es de suma importancia la creación de métodos de multiplicación masiva que garanticen una mayor producción en poco tiempo y con características fitosanitarias deseables.

¹ Académico y encargado del área de suculentas en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM)

Una de las herramientas que pueden lograr este propósito es la propagación *in vitro*, en donde la multiplicación de plantas es obtenida a partir de diversos tejidos de una planta madre, obteniendo así muchos ejemplares de poco material vegetativo, una vez terminada la técnica si se realiza bien la técnica estudiada.

Debido a las razones anteriores, en este trabajo se plantearon como objetivos establecer las condiciones *in vitro* para la propagación de *Pachyphytum compactum* a partir de la organogénesis de hoja, buscando la propagación masiva como estrategia para el rescate y la conservación de está especie endémica, y a la vez poder fomentar su uso en el mercado de plantas ornamentales.

2. OBJETIVOS

- Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la obtención y multiplicación de plantas de *Pachyphytum compactum*.
- Evaluar medios de cultivo, reguladores de crecimiento y concentraciones *in vitro* en diferentes explantes de *Pachyphytum compactum*.

3. HIPÓTESIS

La propagación *in vitro* de *Pachyphytum compactum* es posible mediante organogénesis directa.

Una concentración moderada de Tidiazurón (TDZ), Benziladenina (BA) y Sulfato de adenina, promoverán la respuesta y desarrollo de brotes y raíces en los explantes de *Pachyphytum compactum*.

No habrá respuestas significativamente diferentes en cuanto al tipo de explante.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. LA FAMILIA CRASSULACEAE

4.1.1. Descripción botánica

La familia Crassulaceae esta formada por plantas suculentas. Son herbáceas (a veces muy pequeñas), anuales, perennes, hasta arbustivas de dos metros de altura, raramente son trepadoras (Lawrence, 1951; Porter; 1967; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Las hojas son basales o caulinas, gruesas, alternadas, opuestas o alternas, simples, enteras y sin estípulas; las caulinas a menudo con la base prolongada más allá de la inserción del tallo. Las flores bisexuales (raramente unisexuales), crecen en cimas, racimos, espigas o panículas; raramente solitarias. Un ejemplo del acomodo de las flores en la inflorescencia, se muestra en la figura uno, de la especie *Sedum acre*. Las flores actinomorfas, perfectas, regulares, pentámeras, hipóginas. Cáliz persistente, los sépalos van de cuatro a cinco, están libres o unidos en la base; los pétalos, que son del mismo número que los sépalos, se encuentran libres o unidos en la base, o a veces hasta la mitad de la corola, de ordinario persistente. Los estambres se encuentran típicamente en dos líneas, definidos en flores gamopétalas, insertados en el tubo de la corola, anteras dehiscentes longitudinalmente; su número es el mismo o el doble de pétalos. Los carpelos usualmente libres, algunas veces unidos en la base, cada carpelo está asociado a apéndices glandulares, representando, tal vez, carpelos adicionales, como se muestra

en la figura dos. El ovario es superior, 1 – locular, 1 – carpelado, con muchos óvulos, raramente pocos, la placentación parietal, un estilo usualmente tubulado o filiforme, un estigma; placentación parietal. Se puede observar la forma general de la estructura de la flor de las crasuláceas en la figura uno con *Sedum acre*. El fruto de cinco folículos. Un ejemplo de la inflorescencia y Las semillas muchas, con un embrión con endospermo carnoso (Lawrence, 1951; Porter, 1967; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

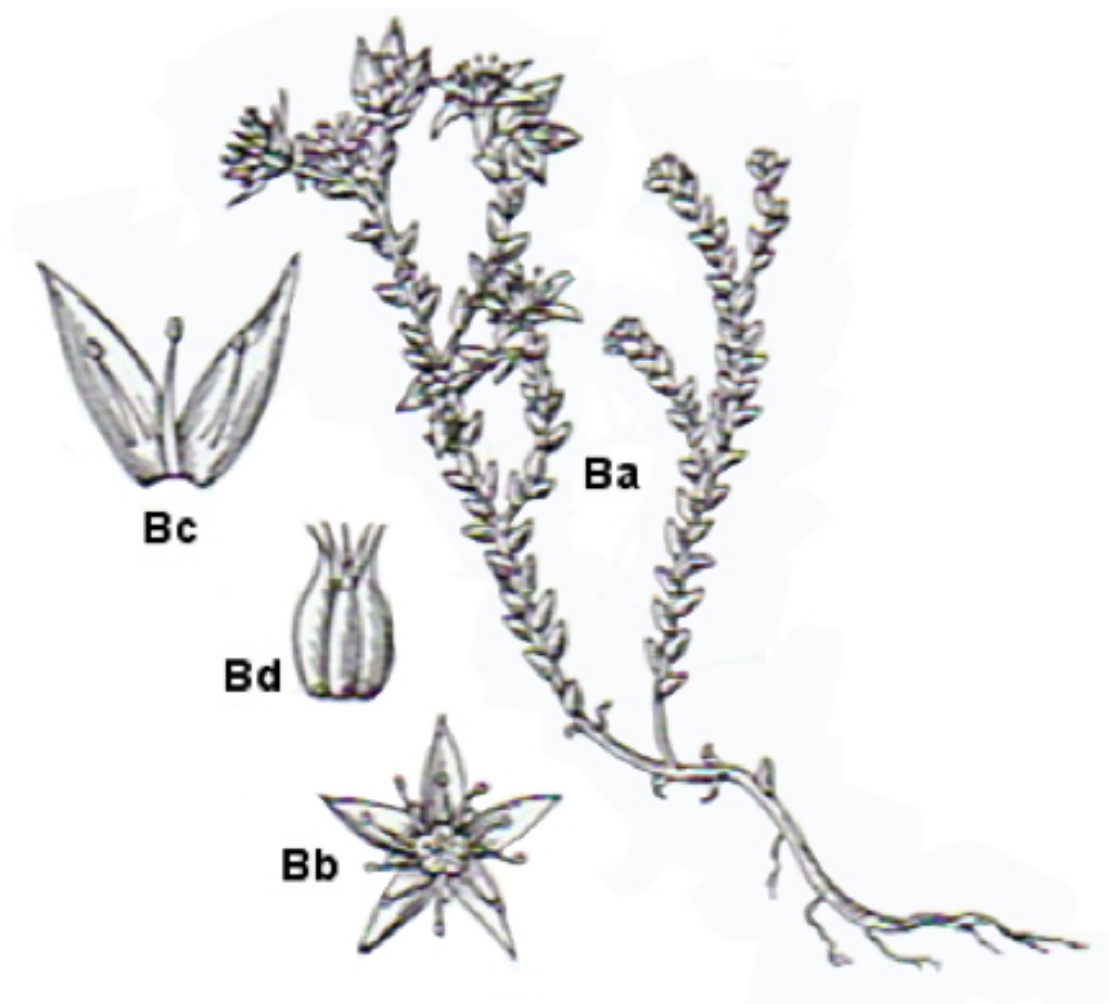


Figura 1. Inflorescencia de *Sedum acre*. **Ba.** Hábito de la flor. **Bb.** Vista frontal de la flor. **Bc.** Dos pétalos y estambres. **Bd.** Pistilos. Fuente: Lawrence (1951).

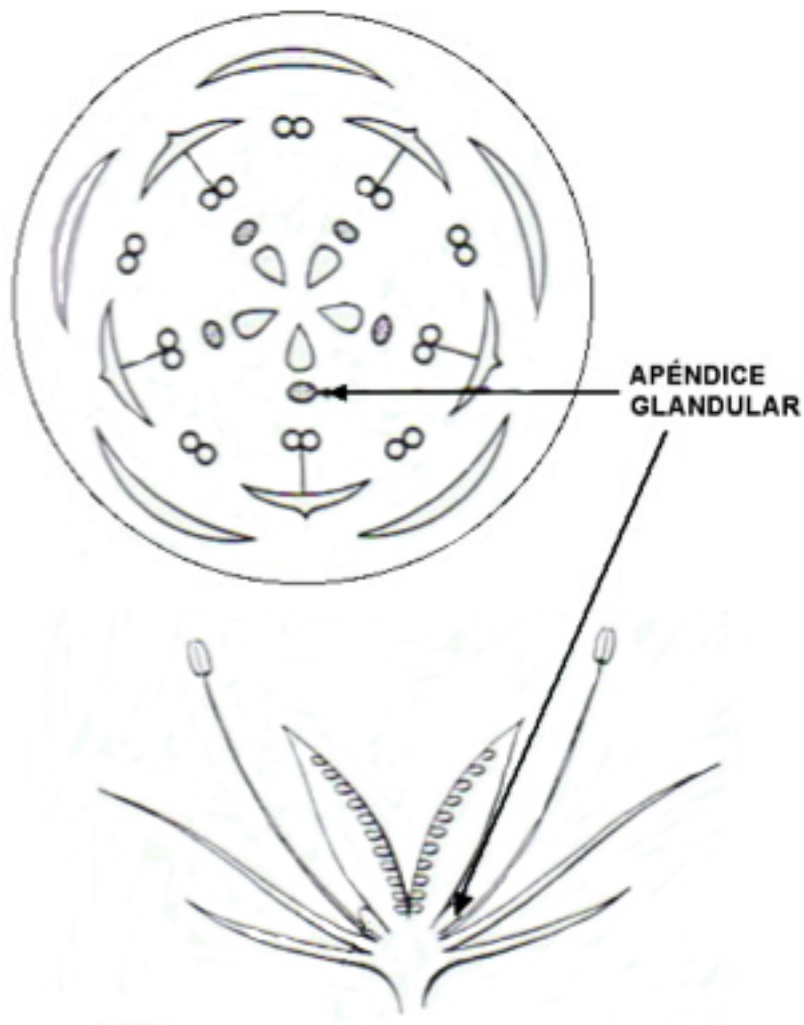


Figura 2. Apéndices glandulares en los carpelos en el género *Sedum*. Fuente: Porter (1967).

4.1.2 Taxonomía de la familia Crassulaceae

Repartidos en las seis subfamilias, existen 35 géneros y 1500 especies. La familia está dividida en seis subfamilias: Crassuloideae, Kalanchoideae, Cotyledonoideae, Sempervivoideae, Sedoideae y Echeverioideae, en la figura 3 pueden observarse las diferentes familias y su lugar de origen (Lawrence, 1951; Porter, 1967; Meyrán y López, 2003; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

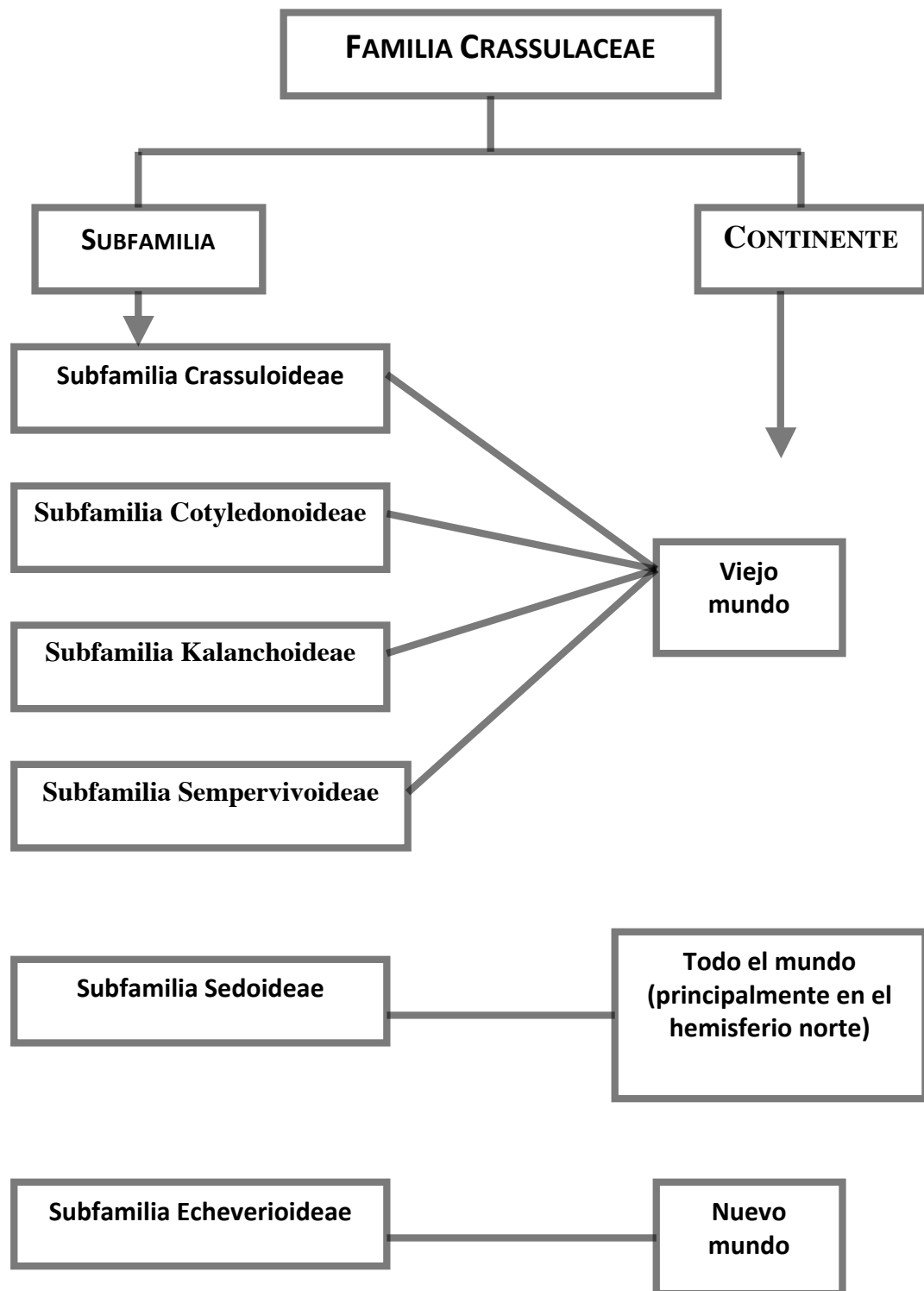


Figura 3. Subfamilias de la familia Crassulaceae y su localización. Fuente: Meyrán y López, (2003)

En cuanto a México, se tienen siete géneros exclusivos, que son: *Cremnophila*, *Lenophyllum*, *Dudleya*, *Villadia*, *Graptopetalum*, *Thompsonella* y

Pachyphytum. (Ver figura 4). Aparte de los siete géneros ya mencionados, México también posee tres géneros muy importantes, dado que la mayor parte de las especies que les representan son endémicas de México. Estos géneros son: *Echeveria*, *Sedum*, y *Tacitus*. Lo anterior, da como resultado 342 especies mexicanas que representan 25 % de las crasuláceas en el mundo (Ávila et. al., 2005).

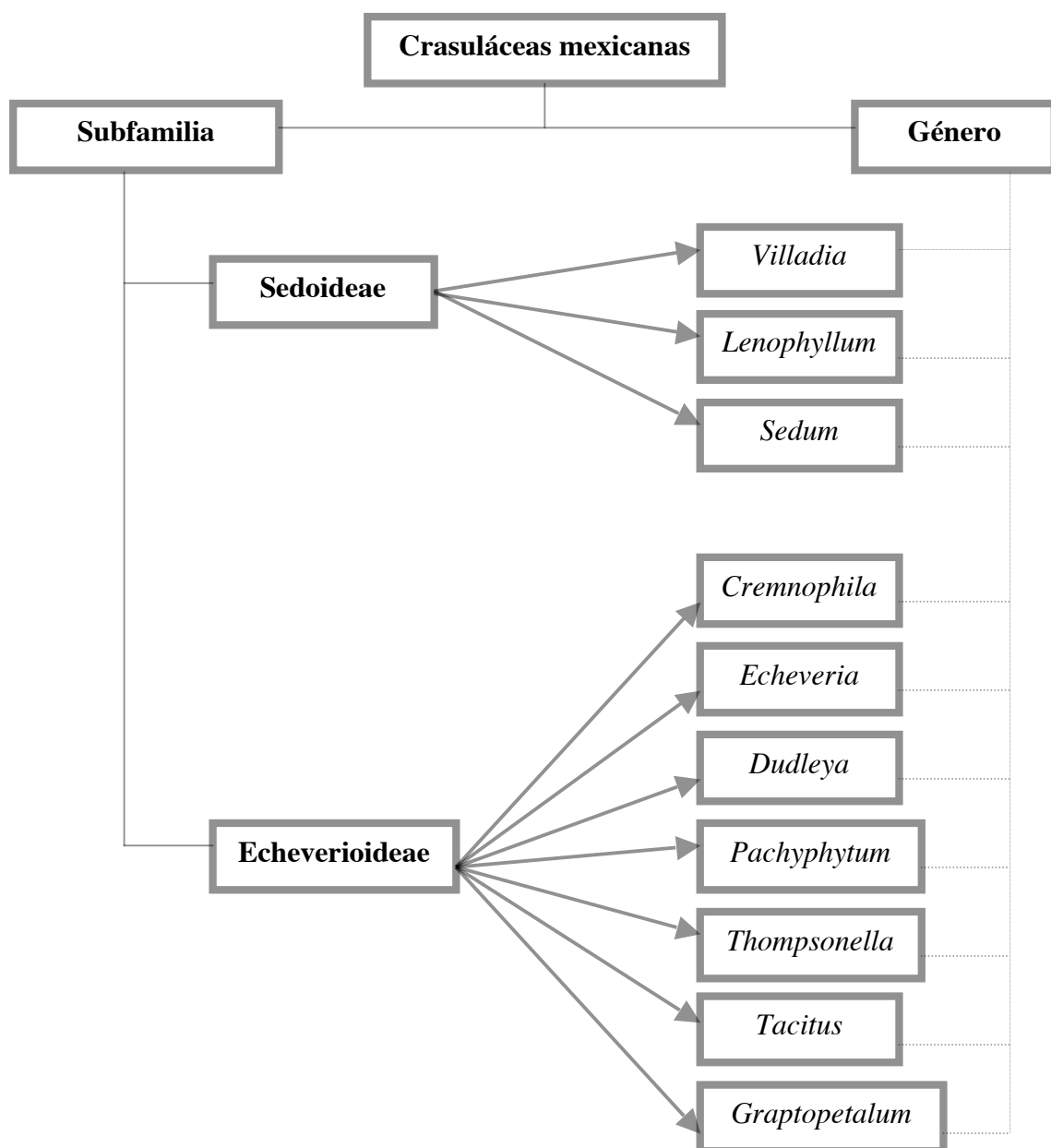


Figura 4. Subfamilias y géneros mexicanos de la familia Crassulaceae. Fuente: Meyrán, (1988).

4.1.3. Distribución

Las crasuláceas se distribuyen alrededor de todo el mundo, a excepción de Oceanía. La mayor parte se encuentra en Asia central, Sudáfrica, el Mediterráneo y América (Lawrence, 1951; Rzedowski y Rzedowski, 2001). Dentro de lo que es América, México contiene el mayor número de estas especies endémicas, por lo que es un centro muy importante de diversidad. La mayoría se encuentran dentro de los matorrales xerófitos. Sin embargo, también existen crasuláceas en zonas templadas y cálido – húmedas, dentro de los bosques de pino – encino, bosques de encino y selvas bajas caducifolias preferentemente en pequeñas poblaciones repartidas en microambientes como: *enclaves xerofíticos* (Meyrán y López, 2003).

Los estados en la República Mexicana que presentan mayor diversidad son: Oaxaca, Baja California, Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla y Nuevo León (figura 5). Se les localizan desde 200 m.s.n.m (por ejemplo en Juchitán, Oaxaca) hasta los 4200 m.s.n.m en el volcán Popocatepetl, Estado de México (Ávila *et al.*, 2005).



Figura 5. Estados de la República mexicana con mayor diversidad de crasuláceas.

4.1.4. Importancia

A nivel mundial, las crasuláceas, junto con las cactáceas y otras suculentas, poseen importancia como ornamentales, donde existen muchos coleccionistas que pagan por algunos ejemplares a elevados costos.

En México, su uso principal es como plantas de ornato, sin embargo, también se reporta que tienen usos medicinales, como es el caso de *Sedum praealtum* o *Sedum dendroideum* (“siempreviva”), que se utiliza en la medicina tradicional para lavar los ojos, curar quemaduras y lavar encías (Martínez, 1969; Meyrán y López, 2003).

Actualmente, las crasuláceas, junto con otras familias botánicas suculentas o con ejemplares suculentos, se han comenzado a utilizar ampliamente en las nuevas tendencias de jardinería como la naturación urbana que implica: paredes vivas, techos verdes, y en parques y jardines urbanos; esto es gracias a que estas plantas poseen un sistema radicular poco profundo, por lo que no se requiere de mucho sustrato para lograr cultivarla. A su vez, esta característica ayuda a evitar la erosión y a la recuperación de suelo gracias a que forman un cubresuelos. Otras características deseables para su uso son: resistencia a altas temperaturas (arriba de los 30 °C), resistencia a las bajas temperaturas (abajo de los 2 °C), insolación plena, a la sequía y falta de cuidados.

En el mercado de ornamentales mexicano, la producción se concentra en cuatro especies (81 % del total de la producción), correspondiendo 29% a gladiolas, 26 % a flores (en macetas y semilla), 15 % al cempazuchitl y 11 % a

rosas (SAGARPA, 2004), y dentro de 19% restante de ornamentales vendidas, se encuentran las crasuláceas, donde se venden aproximadamente medio millón de crasuláceas como ornamentales o para su uso en techo verdes. Se calcula que se usan alrededor de 100 000 de ellas para su uso en azoteas verdes en la ciudad de México (J. Reyes, 2012, com. personal²).

A la familia Crassulaceae no se le ha considerado del todo para su preservación, ya que no sólo solo unas cuantas especies se encuentran en la Norma ecológica 59, y también su propagación, incluso convencional, es muy escasa aun. Sin embargo, la gran mayoría de las especies mexicanas poseen poblaciones reducidas en su medio natural debido a su extracción para su venta como ornamentales o por destrucción de su hábitat. En cuanto a la propagación *in vitro*, existen varias especies extranjeras que se han propagado exitosamente *in vitro*, como lo son: *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Sedum alfredii*, *Rhodiola kirilowii*, *Bryophyllum pinnatum*, *Bryophyllum daigremontianum*. Sin embargo en especies mexicanas, sólo se sabe de la propagación *in vitro* realizada con éxito en *Echeveria laui*, sin embargo no existe mas información al respecto para otras especies. *Pachyphytum compactum* es uno de esos casos, de la cual se desconoce el estatus de su población natural; sin embargo, su distribución se restringe a la región de Hidalgo y Querétaro. Tampoco se le propaga mas que en algunos jardines botánicos o invernaderos especializados en pequeñas cantidades, por lo que esta situación la ubica dentro de las especies cuya población es susceptible al saqueo dado su potencial ornamental para su uso en la nueva

² Académico y encargado del área de suculentas en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM)

tendencia a la naturación urbana y su atractivo (como otras crasuláceas mexicanas) en el extranjero. Se trata de un caso, entre muchos, en los que se debe de tomarse cartas al respecto.

Aun queda mucho que investigar sobre las propiedades y usos de las crasuláceas, su potencial como plantas útiles es muy grande, por ejemplo, se puede explorar su utilización como mejoradoras de suelo, purificante y/o almacenaje de agua, tema importante ante la presente problemática de la preservación y reciclaje del agua potable (Rodríguez, 2007).

4.1.5. Propagación convencional

La familia Crassulaceae puede multiplicarse de forma convencional sexual y/o vegetativamente. Entre la forma vegetativa es por medio de: hojas, tallos o hijuelos. La propagación por semilla únicamente se da cuando la polinización ha sido cruzada, ya que las crasuláceas no producen semilla viable si se han autopolinizado, esto debido a mecanismos de autoincompatibilidad, para promover la diversidad genética. Esto suele ser un problema ya que se limita la propagación sexual, ya que en muchas ocasiones, es complicado obtener planta proveniente de distintos padres; sin embargo, este tipo de propagación es de suma importancia ya que es importante para preservación de especies en riesgos de extinción al tener una amplia gama de diversidad genética (Haage, 1963).

En cuanto a la propagación vegetativa, esta es fácil y práctica en muchas especies de la familia Crassulacea, como sucede con *Sedum rubrotinctum*, *Echeveria secunda*, *Sedum burrito*, *Graptopetalum paraguayense*, etc. Sin embargo, existen muchas otras especies donde esta práctica no es posible o se dificulta ya que requieren de condiciones muy específicas de cultivo para que prosperen, en especial las de género *Echeveria* (*Echeveria laui*) y diversas especies del género *Pachyphytum*, que requiere de temperaturas cálidas constantes (por arriba de los 30 °C). Aunado a lo anterior, su tasa de crecimiento de estas especies es muy lenta, por lo que se requiere de mas de un año para que alcancen una forma adulta juvenil. Estas dos ultimas características les da una gran desventaja en campo ya que no alcanzan a propagarse con rapidez y la destrucción y su saqueo es mayor a su tasa de reproducción. De la misma forma, esto también es un problema cuando se trata de propagación para producción comercial, ya que la obtención de planta comercial resulta ser un largo proceso.

4.1.6. Anatomía de la hoja

La anatomía interna de las hojas se ha enfocado en la organización de las células para llevar a cabo su sistema fotosintético CAM y en la estructura básica para su propagación vegetativa. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre las características de los órganos de estas plantas para su uso en la propagación *in vitro*.

De modo general, en todas las especies de la familia Crassulaceae, las hojas poseen una zona meristemática en su base, cuya superficie se reduce conforme avanza la edad de la hoja, es decir, es mayor en hojas jóvenes. Gracias a esta zona, las crasuláceas pueden generar nuevos individuos a partir de este órgano. Por otra parte, estudios histológicos como el realizado por Stout (1938), enfocándose en la reproducción vegetativa de *Kalanchoe rotundifolia*, muestran que no existe este tejido meristemático en la porción media de la hoja (ver figura 6), y en cambio los patrones vasculares en hojas de *Crassula argentea*, difieren del patrón reticular comúnmente encontrado en la mayoría de las dicotiledóneas, ya que el haz vascular no se limita al plano central de la hoja, sino que también se extiende en una red de venas mayores y menores, según lo reportó Rost (1969), como puede observarse en la figura 7.

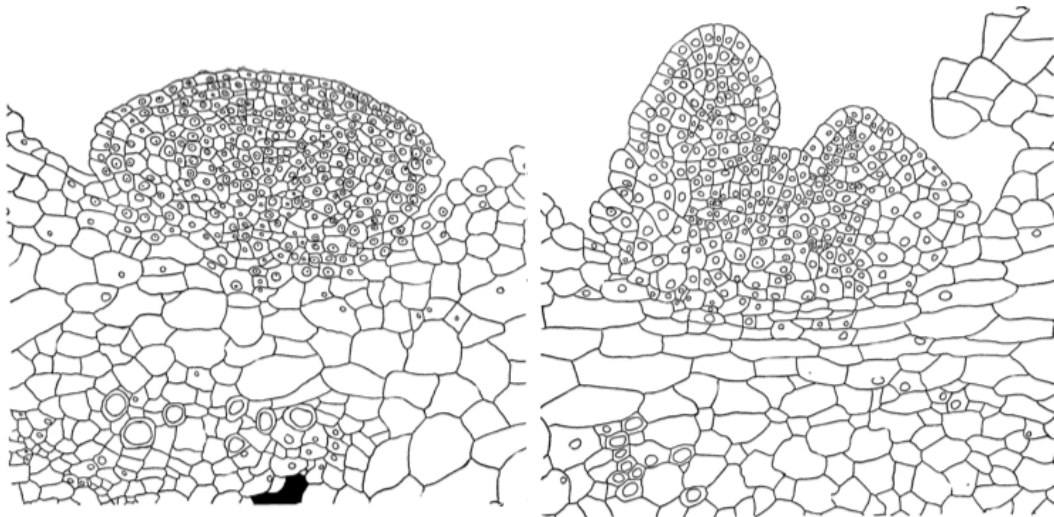


Figura 6. Células meristemáticas en la base de hojas de *Kalanchoe rotundifolia* en proceso de diferenciación a primordios de hojas. Fuente: STOUT (1938).

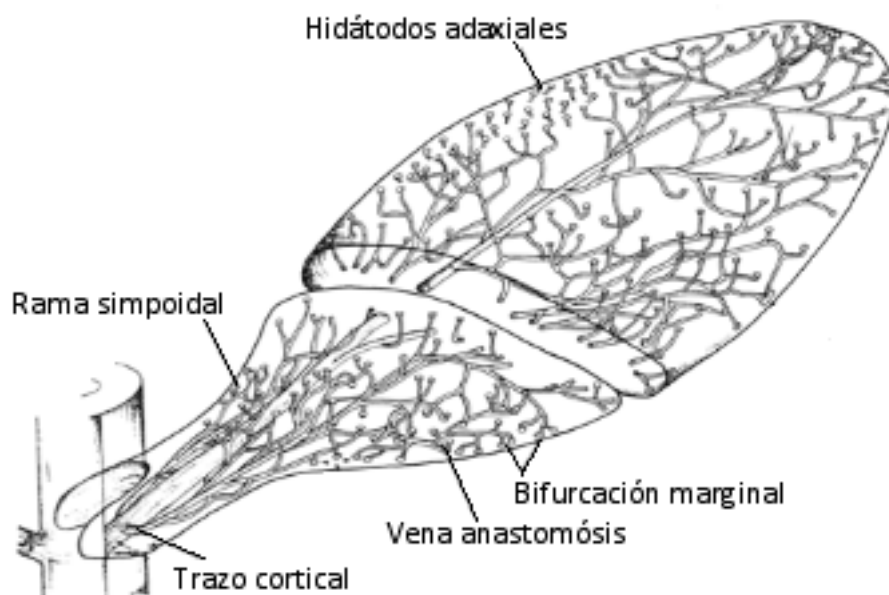


Figura 7. Diagrama de los patrones de venación e hidátodos de *Crassula argentea*. Algunas venas fueron omitidas para dar mayor claridad, y las presentes fueron engrosadas para enfatizarlas. Tomado de: ROST (1969)

4.2. DESCRIPCIÓN DE *Pachyphytum compactum* Rose.

Según lo describe Meyrán y López (2003) y , el género *Pachyphytum* consiste en plantas perennes, subfrutescentes, con tallos más o menos ramificados; hojas alternas en rosetas más o menos alargadas, muy gruesas, aplanadas con los bordes gruesos, a veces cilíndricas, obtusas, verde grisáceas a blanco pruinosas como pueden observarse en la figura 8. Las inflorescencias son en cincinos solitarios, al principio colgante, al final erecto, las brácteas a menudo muy grandes, sépalos apresadores de la corola, ovados a oblongos, iguales o desiguales, más cortos o más largos que la corola; pétalos erectos, separados entre sí, algo extendidos en la punta, con dos apéndices en los lados del nacimiento del filamento epipétalo, los estilos cortos, los nectarios anchos (Figura 8). Los número cromosómicos de este género varían entre $n= 31$ y 33 .

Unos de los caracteres taxonómicos mas importantes de este género, son los apéndices en la cara interior de los pétalos, a los lados de la base de los filamentos epipétalos.

Pachyphytum compactum posee tallos de hasta 20 cm de largo, las hojas se agrupan en tres a siete cm en el extremo de las ramas. Las hojas son ovado – lanceoladas, de agudas a subagudas, con finas aristas blanquecinas en la superficie, principalmente en las jóvenes, de 2 a 2.5 cm de largo, 10 a 12 mm de ancho, siete a 8 mm de grosor, verde grisáceas con zonas purpúreas hacia la punta (Figura 8). Tallo floral hasta de 4 dm de alto con 10 hojas obovadas u oblongas, espolonadas de 5 – 6 mm de largo, inflorescencia en cincino con 7 – 10 flores, brácteas lanceoladas, agudas, de 5 mm de largo, sépalos triangular ovados, de 3 a 8 mm de largo, pétalos de 7 – 10 mm de largo, rojizos con la punta verdosa (Figura 8). Cromosomas $n=31, 62, 124, 186$ (Apezteguía y Rodríguez, 1999; Eggli, 2003; Meyrán y López, 2003).

La localidad tipo es Hidalgo, Ixmiquilpan. La distribución: Hidalgo, Ixmiquilpan; Querétaro, La Cañada, Colón, cerro El Mexicano, entre Higuierillas y Tolimán. La localización de ambos lugares puede observarse en la figura 9 (Apezteguía y Rodríguez, 1999; Meyrán y López, 2003).



Figura 8. Izq. Inflorescencia de *P. compactum*. Izq. y arquitectura de *P. compactum*.

4.2.1. La propagación de *P. compactum*

La propagación convencional de la crasulácea *P. compactum* es lenta y difícil, ya que la propagación sexual es cruzada, de tal modo que con la autofecundación solo produce semillas inviables. La propagación sexual es un proceso lento para obtener plantas juveniles, tardándose mas de un año para obtenerlas.

La propagación vegetativa no siempre es exitosa, muriendo muchas de las hojas que se colocan a enraizar. Los esquejes sobrevivientes crecen a razón de 5 cm por año y se obtiene un solo ejemplar.

La propagación convencional es difícil y la extracción de *P. compactum* de su medio natural, merman su población natural y además reduce las posibilidades de su aprovechamiento, por lo que es importante encontrar un método de propagación masiva, lo cual puede obtenerse por medio de la propagación *in vitro*, herramienta útil de propagación en muchas familias afines como la Cactaceae y Agavaceae.



Figura 9. Localidades tipo de *P. compactum*. Izq. La localidad tipo en Querétaro se ubica entre Tolimán e Higuierillas. Abajo. La localidad tipo en Hidalgo se ubica en Ixmiquilpan

4.3. LA MICROPROPAGACIÓN

4.3.1. Antecedentes de la micropropagación

La propagación *in vitro* (del latín “en vidrio”) o el cultivo de células y tejidos vegetales, se refiere al conjunto técnicas mediante las cuales se hace crecer células, tejidos u órganos vegetales de forma aséptica en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas en presencia de una dieta balanceada en nutrientes y hormonas. (Villalobos y Thorpe 1993; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Calva y Pérez, 2005).

El principio básico de esta técnica es la totipotencialidad de las células y el balance hormonal sugerido por Skoog *et. al.* en 1975. La totipotencia, como lo escriben Calva y Pérez (2005) citando a Ferl y Paul (2000), indicia que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa por medio de la división y diferenciación celular. Con respecto al balance hormonal, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, las células tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plántulas completas. Esta capacidad es única en plantas, no puede encontrarse en animales superiores (Villalobos y Thorpe 1992; Abdelnour –Esquivel y Escalant, 1994; Matos *et al.*, 2010)

La propagación *in vitro* es una herramienta útil para (Calva y Pérez, 2005; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994):

- 1) La micropropagación
- 3) Mejoramiento genético,
- 4) Obtención de plantas libres de virus y otros patógenos,
- 5) Conservación de germoplasma
- 6) Biosíntesis de metabolitos
- 7) Investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica
- 8) Obtención de clones somáticos

Del mismo modo, la micropropagación ha mostrado importantes ventajas en comparación con los métodos convencionales de propagación, como son (Villalobos y Thorpe 1993):

- 1) Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- 2) Reducción del tiempo de multiplicación.
- 3) Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, en tiempos cortos
- 4) Mayor sanidad del material que se propaga
- 5) Facilidad para transportar el material vegetal de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- 6) Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan poco individuos.

Sin embargo, tal y como lo menciona McDonald (1986), existen algunas limitantes en la propagación *in vitro*, tales como:

- 1) La inversión inicial en cuanto a laboratorio, equipo y reactivo puede ser muy alta.
- 2) Requiere de mano de obra calificada.
- 3) Muchas especies aun no son comercialmente exitosas, lo que requerirá de mayor estudio.
- 4) Algunas especies presentan problemas asociados a la formación de raíces y establecimiento en invernadero.
- 5) Posible sobreproducción de material vegetal con plantas no tan comerciales.

Villalobos y Thorpe (1993) mencionan que Murashige (1974) propuso tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo, 2) su multiplicación; y 3) el enraizamiento y aclimatación a suelo. De estos tres pasos, el medio de cultivo y la incubación son factores clave para lograr el cultivo de tejidos.

En cuanto al medio de cultivo, este debe ser el apropiado, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes, sino su preparación. En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos. En general, el medio de cultivo esta compuesto por (Villalobos y Thorpe, 1993; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994):

- a) Carbono: proporcionado generalmente por el azúcar

- b) Nutrimientos minerales: macro y micro elementos esenciales para el crecimiento de las plantas
- c) Vitaminas
- d) Agente gelificante
- e) Reguladores de crecimiento

Entre los reguladores de mayor uso están las auxinas y las citocininas. Las auxinas que más se utilizan son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB). Las citocininas que más se emplean son: kinetina (KIN), benciladenina (BAP) y zeatina (ZEA) (Villalobos y Thorpe, 1993).

En lo que se refiere a la incubación de los cultivos, esta debe ser en ambientes controlados en cuanto a luz, temperatura y humedad. Estos factores son de suma importancia, que en conjunto con los factores fisicoquímicos y nutricionales, conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. La temperatura de los cultivos generalmente se controla entre 25 y 28 °C, el pH entre 5.2 y 6.5 y la luz de 0 a 12 000 lux (Villalobos y Thorpe, 1993; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Calva y Pérez; 2005).

4.3.2 La micropropagación en el rescate de especies con problemas de reproducción convencional

La importancia de preservar especies tanto como animales como vegetales, ha ido tomando importancia en los últimos años, no sólo para mantener la diversidad, sino también porque en años recientes se han encontrado que poseen valor económico, medicinal u otro tipo de importancia para el ser humano. Como lo menciona Quiala *et al.* (2004) esto también provoca la explotación de las especies : “La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas ”. Sin embargo, esta creciente importancia también aumenta su demanda haciendo que las poblaciones en el campo se reduzcan, sobre todo cuando las especies tienen condiciones muy particulares de reproducción. Debido a esto, es de suma importancia que exista la reproducción *ex situ* de estas plantas, no sólo para poder satisfacer las necesidades humanas, sino también para la preservación del material genético.

La multiplicación intensiva de plantas empleando las técnicas desarrolladas *in vitro* ha sido una poderosa herramienta en la floricultura del siglo XX, mas aún cuando se habla de especies en peligro de extinción, con problemas de reproducción, de lento crecimiento y/o con reducción de su población natural debido a la destrucción de su hábitat (Villalobos *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 2006).

La micropropagación es un método que puede utilizarse para el rescate de estas plantas gracias a que resuelve ciertas limitaciones asociadas con la propagación convencional. La micropropagación es un proceso más rápido, donde se aseguran plantas sanas, y se producen en grandes cantidades a partir de solo un pequeño pedazo de tejido, disminuyendo la presión de cosecha en aquellas especies con importancia económica al poder ofrecer una mejor oferta de dichas especies (Clayton *et al.*, 1990; Liao *et al.*, 2006; Choreño-Tapia *et al.*, 2002). Sin embargo, también existen algunos problemas ya que en muchas ocasiones se propagan muchos individuos con la misma información genética a menos que exista la variabilidad somaclonal con lo que podría ayudar a restaurar la diversidad genética y complementar las poblaciones en sus hábitats naturales (Mikulík, 1999; Hawkins *et al.*; 2007).

4.3.3. La micropropagación en especies suculentas

La propagación de especies leñosas y suculentas es relativamente reciente remontándose a los años 80's (Villalobos *et al.*, 1993). La propagación en especies suculentas es de suma importancia, ya que como lo reporta Amoo *et al.* (2009) citando a Malda *et al.* (1999), casi todas las especies de plantas suculentas están afectadas por la destrucción de su hábitat y por el tráfico ilícito de ellas. Se menciona que las especies cuyas poblaciones se encuentran en zonas muy delimitadas poseen altos grados de endemismo y por tanto, son más vulnerables que aquellas que se encuentran ampliamente distribuidas. Las modificaciones al hábitat o la introducción de especies extrañas de plantas o animales pueden convertir a las pequeñas poblaciones estables en poblaciones altamente inestables en corto tiempo. Otra dificultad

que presentan las plantas suculentas, es su alta demanda en el mercado y su poco abastecimiento, lo que ocasiona que muchos ejemplares sean extraídos directamente del campo en forma de contrabando. Esta actividad ha llevado incluso a la exterminación de algunas especies ya que la habilidad recolectora excede a la tasa natural de reproducción. Aunado a estos dos factores, está su lenta y difícil propagación, ya que aunque puedan propagarse vegetativamente, en muchos casos, no pueden obtenerse muchas estacas de una planta madre (Fay, 1999; Choreño-Tapia *et al.*, 2002).

Debido a esto, aunque no estén reportadas, muchas especies se encuentran en peligro de desaparecer en su medio natural.

Actualmente la micropropagación de especies de zonas áridas y semiáridas incluye un gran número de familias botánicas, pero entre las especies más trabajadas se encuentran: jojoba (*Simmondsia chinensis*), asclepiadaceas, cactáceas y agaves (Amoo *et al.*, 2009; Villalobos *et al.* 1993) . Muchas veces, en estas especies, la propagación convencional por semillas es poco empleada a causa de la amplia segregación en la progenie, la baja germinación de las semillas y por el largo período juvenil que muestran los individuos; y en cuanto a la propagación vegetativa, muchas veces hay poca o nula presencia de hijuelos (Clayton *et al.*, 1990; Villalobos *et al.*, 1993).

Villalobos *et al.* (1993) consideran que para una eficiente explotación de las especies que crecen en zonas áridas, se requiere del establecimiento de sistemas intensivos de producción, donde se aprovechen más eficientemente los limitados recursos de suelo y agua. Sin embargo, es evidente que para

implementar estos sistemas se necesita una gran cantidad de clones seleccionados, requisitos que limita los métodos tradicionales de propagación.

La propagación *in vitro* también podría resolver los problemas de germinación de semillas que no ha sido producto de la polinización cruzada, ya que amplificaría el número de semillas que por medios convencionales, no son aprovechables. También permitiría una alta producción de crasuláceas amenazadas o con requerimientos específicos de propagación que limitan su rápida multiplicación.

4.3.4. La micropropagación en crassuláceas

La micropropagación de plantas de la familia Crassulaceae se ha dado en varias especies no mexicanas, en países como Japón, Pakistán y Estados Unidos. Jaiswal y Sawhney (2006) trabajaron con *Kalanchoe pinnata*, crasulácea de origen africano, donde estudiaron las respuestas morfogénicas inducidas por el Thidiazuron (TDZ) en explantes foliares de yemas con o sin yemas epifilas para también evaluar su posible mediación de auxinas al usar una anti-auxina conocida como TIBA. Encontraron que las yemas epifilas cultivadas sin hormonas se desarrollaron en plántulas sanas, mientras que aquellas creciendo en medio con 10^{-6} M de TDZ crecieron plántulas compactas, enanas, sin raíces y con hojas cloróticas. El TDZ también causó un alargamiento de los explantes así como crecimiento hipertrófico. El TIBA modificó las respuestas provocadas por el TDZ, donde se revirtió el crecimiento hipertrófico y se restauró la pigmentación de las hojas, más no el alargamiento del explante. Esta respuesta indicó que en *Kalanchoe pinnata* si

existe la mediación de auxinas. Por otra parte Sanikhani *et al.* (2006), estudiaron la regeneración de brotes inducidos mediante el TDZ y ANA en varios cultivares de *Kalanchoe blossfeldiana*, crasulácea africana. En esta investigación encontraron que el TDZ mejoró notablemente la regeneración de brotes y la frecuencia y número de brotes por explante, mientras que el ANA no mejoró la regeneración de brotes. Las concentraciones de TDZ óptimas dependieron de cada cultivar.

Por su parte, Naz *et al.* (2009) trabajaron con las crasuláceas *Bryophyllum pinnatum*, *Bryophyllum pinnatum* y *Bryophyllum daigremontianum*, y desarrollaron un protocolo para su rápida multiplicación *in vitro*. Utilizaron secciones de hoja como explantes, las cuales fueron cultivadas en medio de cultivo con diferentes concentraciones de TDZ, BA y ANA. El TDZ en bajas concentraciones (5 μ M y 10 μ M) promovió múltiples brotes y raíces en *B. daigremontianum*. El BA y el ANA no mejoraron la regeneración de brotes.

Khan *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo para la regeneración directa de la crasulácea africana *Kalanchoe tomentosa*, donde se probaron diferentes concentraciones de BA y ANA. La mayor longitud de raíces, el mayor número de brotes, hojas, raíces y plántulas obtenidas fue en el medio de cultivo sin hormonas, por lo cual sugieren que los reguladores de crecimiento no juegan un papel importante en la multiplicación y la organogénesis de *K. tomentosa* al poseer las concentraciones de hormonas endógenas necesarias para esto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, durante los meses de julio a noviembre de 2011.

5.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal sano se obtuvo de 12 plantas madre de *P. compactum*, provenientes del Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México y de un invernadero privado en Ajijic, Jalisco. Las plantas fueron de 4 años de edad.

5.3. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO*

5.3.1. Selección de explantes

En los estudios en los que se han propagado crasuláceas *in vitro*, se han utilizado como explantes brotes laterales, la punta de brotes foliares, y segmentos de hoja, como ha sido el caso de investigaciones como lo trabajaron Khan *et al.* (2006) en *Kalanchoe tomentosa*, Jaiswal y Sawhney (2006) con *Kalanchoe pinnata* y Zych *et. al.* (2005) con *Rhodiola kirilowii*. Con base en dichas referencias, en los estudios previos a esta investigación, se

probaron explantes de tallo y hojas seccionadas en dos partes de *P. compactum*, así también se hicieron ensayos de cultivo de anteras y óvulo.

5.3.2. Desinfestación del material vegetal

Las plantas madres fueron tratadas previamente durante 15 días con el fungicida sistémico y de contacto Promyl ®, en una dosis de 30 gramos por cada 100 l de agua. Este fue asperjado uniformemente sobre todo el cuerpo de las plantas.

Se cortaron explantes maduros de las plantas madres, los cuales se llevaron al laboratorio de cultivo de tejidos en donde se lavaron con agua corriente para remover las partículas de polvo y tierra. Se tomo como base la metodología empleada para el cultivo *in vitro* utilizada en el laboratorio de cultivo de tejidos de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde los explantes se lavaron en una solución de agua con jabón adicionado con cinco gotas de Tween 20 ® durante 10 minutos. Para la desinfestación, los explantes se sumergieron en alcohol etílico al 70 % durante tres minutos. Después de los tres minutos, se decantó el alcohol y sin enjuagar, se procedió a sumergir los explantes en hipoclorito de sodio. Se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, probándose concentraciones al 5 %, 10 % y 30 % durante 15 minutos; pasado este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada con ácido ascórbico ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y ácido cítrico ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para remover los residuos del hipoclorito de sodio. Se desechó el agua de los enjuagues en otro recipiente.

5.3.3. Control del necrosamiento

Los explantes de *P. compactum* mostraron un alto porcentaje de necrosamiento de los tejidos, tal como sucede con otras plantas suculentas de otras familias botánicas, donde la pérdida llega a ser hasta 80 % (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Aliyu y Mustapha, 2007; Ramírez-Malagon *et al.*, 2007).

Para controlar el necrosamiento se evaluaron distintos componentes que se incluyeron al medio de cultivo y estrategias, los cuales se mencionan a continuación:

- ✧ Adición de ácido cítrico ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y ácido ascórbico ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) combinados al medio de cultivo MS.
- ✧ Adición de carbón activado ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) al medio de cultivo MS.
- ✧ Cambio de posición de los explantes en el medio de cultivo contenido en cada frasco Gerber
- ✧ Agitación de los explantes en agua destilada estéril con antioxidantes [ácido cítrico ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y ácido ascórbico ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)] durante 12 horas.

5.3.4. Selección de reguladores de crecimiento

Debido a que no hay investigaciones sobre la propagación *in vitro* de *P. compactum* se realizaron pruebas con distintos reguladores de crecimiento.

Los reguladores de tratamientos fueron seleccionados acorde a los comúnmente utilizados para la propagación de otras suculentas como las cactáceas o ejemplares de la misma familia Crassulaceae. Especialmente se

ensayaron los siguientes reguladores: Benziladeninda (BA), Ácido Indolacético (AIA) y Thidiazurón (TDZ). El TDZ es un regulador frecuentemente usado en reproducción *in vitro* en especies de la familia Crassulaceae, y se ha observado que en bajas concentraciones, promueve el desarrollo de brotes foliares y raíces. El BA y el AIA son reguladores más frecuentemente usados en cactáceas promoviendo la organogénesis. Las evaluaciones de los reguladores fueron realizadas en combinaciones entre $1.0 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.0 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benziladeninda (BA) con $0.1 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.3 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ Ácido Indolacético (AIA); y $1.2 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ y $5.0 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ de Thidiazurón (TDZ) con $0.5 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.0 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.2 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA. Las concentraciones fueron evaluadas en mililitros, y μmols .

El corte de las hojas se realizó en la cámara de siembra. Los materiales utilizados, fueron: bisturí, caja petri y pinzas esterilizados en autoclave.

5.3.5. Siembra

Los explantes fueron sembrados en frascos Gerber y colocados en la sala de incubación a una temperatura de $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ día y $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ noche, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de $30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El medio de cultivo fué el de Murashige y Skoog (1962) (MS) a 100%, suplementado con 3 % de sacarosa, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, y $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, 0.8 % de agar y pH ajustado a 5.7 ± 0.1 . El medio de cultivo se esterilizó la autoclave a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^2$ de presión.

5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar la investigación, se estableció un diseño completamente al azar, debido a que el experimento se realizó en laboratorio, por lo cual, las condiciones se consideraron homogéneas, es decir, no se tuvieron factores que pudieran generar fuentes de variación en el experimento.

Cada frasco Gerber se consideró como una unidad experimental, manejándose así 240 unidades experimentales repartidas en dos tipos de explante, cada uno con tres tratamientos distintos y un tratamiento control. Se hicieron cambios de medio cada 15 días durante cuatro meses.

El modelo correspondiente está definido de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, r$$

donde:

μ : media general

T: efecto de tratamiento t

E: error aleatorio

$$E \sim N(0, T^2)$$

Por otra parte, para determinar si hubo efecto de tratamientos, fue necesario probar la siguiente hipótesis:

$$H_0: T_1 = T_2 = T_3 = \dots = T_t \text{ vs } H_1: T_i \neq T_{i1}$$

Cabe mencionar que las variables medidas, fueron en su mayoría discretas, es decir, fueron conteos, por lo tanto, fue necesaria aplicar una prueba no paramétrica, que en este caso, correspondió a la Kruskal-Wallis, utilizando un nivel de significancia del 5%.

El estadístico es de la siguiente forma:

$$T = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^t \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1)$$

Donde:

T: número total de tratamientos.

N: número total de respuestas

R: Suma de los rangos de los tratamientos

ni: observaciones.

5.4.1. Variables respuesta

Las variables medidas fueron las siguientes:

- ✧ Tipo de explante: se evaluó la respuesta a emisión de raíz y desarrollo de brotes foliares de los diferentes explantes cultivados bajo los distintos tratamientos, comparando las medias a días de emisión de brotes y raíces, tamaño de brotes, longitud y número de raíces. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

- ✧ Días a emisión de brotes foliares: se contabilizó el número de días en que los explantes emitieron las primeras respuestas de brotes foliares.
- ✧ Número de brotes foliares: se contabilizó el número de protuberancias iniciales que posteriormente se diferencian en brotes foliares.
- ✧ Tamaño de brotes foliares (mm³): se midió el máximo tamaño de crecimiento de la masa foliar, midiéndose el largo, ancho y alto de esta. El crecimiento fue medido con escalímetro.
- ✧ Longitud de tallo (cm): se midió la longitud máxima de crecimiento de tallo originado de cada explante. El crecimiento fue medido con escalímetro.
- ✧ Días a emisión de raíz: se contabilizó el número de días en que los explantes emitieron raíces.
- ✧ Número de raíces: se contabilizó el número máximo de raíces emitidas por explante.
- ✧ Longitud de raíz (cm): se midió la longitud de todas las raíces emitidas por explante. El crecimiento fue medido con escalímetro.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. SELECCIÓN DE EXPLANTES

Los explantes provenientes de tallo fueron muy susceptibles al hipoclorito de sodio a 10 %, necrosándose 100 % de ellos dos horas después de la siembra. Los explantes de hoja tuvieron un mayor porcentaje de sobrevivencia y presentaron desarrollo foliar a partir de los 15 días después de la siembra. En este tipo de explantes, aquellos con un tamaño mayor a 0.5 cm fueron más exitosos. Se encontró que entre menor fue el tamaño de explante, mayor fue el porcentaje de necrosamiento, es decir hay una relación inversa entre el grado de necrosamiento y la edad del explante. Usualmente los explantes se obtienen de las partes jóvenes de la planta como explante debido a que poseen mayor división celular, aumentando las posibilidades de diferenciación y desarrollo de brotes; sin embargo, en los explantes de *P. compactum* provenientes de hojas jóvenes con un tamaño menor de 0.5 cm se presentó necrosamiento en 100 % de los explantes, aun cuando fueron tratados con antioxidantes. Esta reacción fue probablemente debida a una mayor producción de compuestos fenólicos al presentarse una mayor actividad fisiológica.

Respecto a las anteras y los óvulos permanecieron vivos durante dos meses pero sin presentar desarrollo de ningún tipo. Ambos murieron después de dos meses. Los explantes que mostraron una mejor viabilidad fueron aquellos provenientes de hojas de dos años de edad con un tamaño de 1.5 a 2 cm de

largo, seccionados en tres partes y aprovechándose la parte basal y apical de las hojas, eliminándose la parte media de estas (Figura 10).

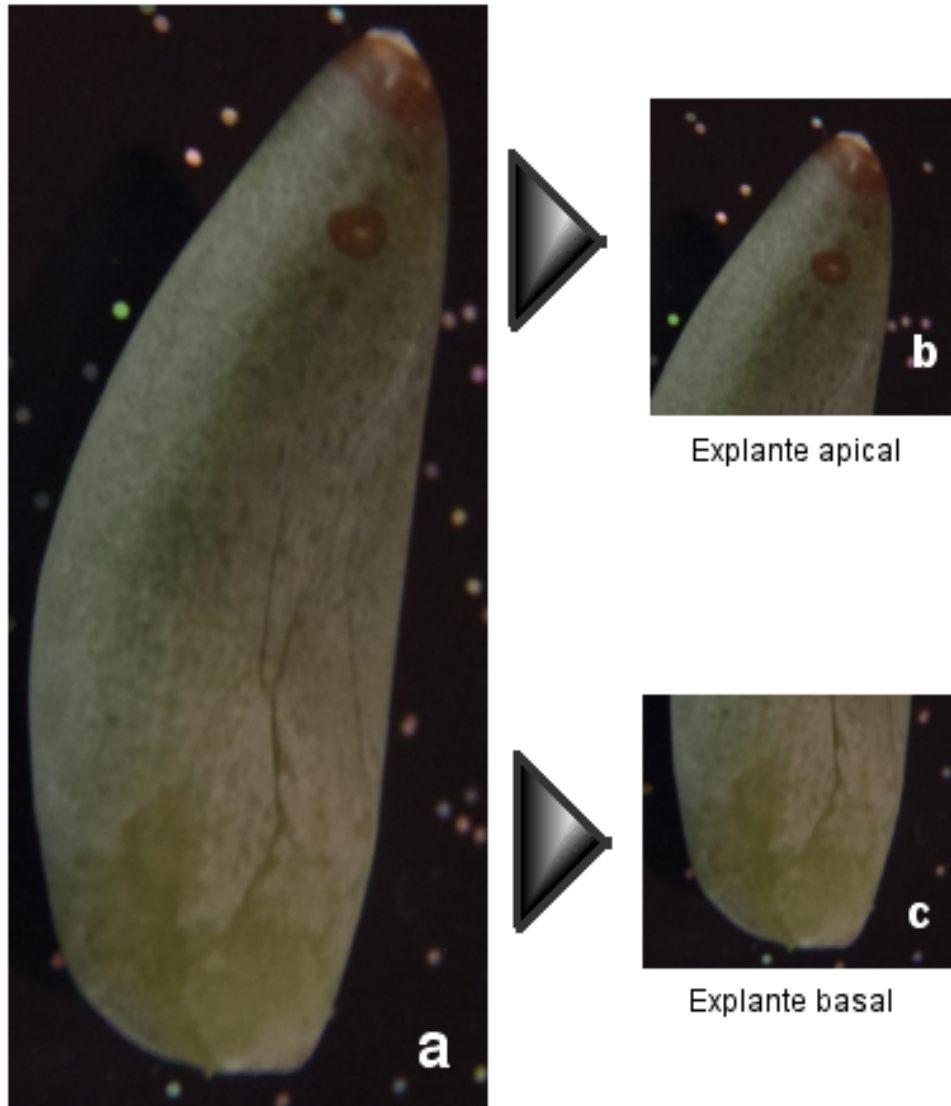


Figura 10. (a) Hoja de *P. compactum*. (b) Corte de la hoja para la obtención de explantes apicales. (c) Corte de la hoja para la obtención de explantes basales.

6.2. DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La desinfestación en la propagación *in vitro* es uno de los puntos críticos, ya que como lo mencionan Fay y Gratton (1999) las suculentas son muy susceptibles a la contaminación fungosa, sin embargo no hay una metodología definida para la desinfectación del material vegetal que será utilizado como explante para la propagación *in vitro*. Los explantes tratados con la concentración 5 % de hipoclorito de sodio presentaron una contaminación de 90 %, la concentración al 30 % de hipoclorito de sodio evitó la contaminación en 100 %, pero también provocó el necrosamiento total de los explantes, mientras que la concentración de 10% de hipoclorito de sodio previno en 90% la contaminación sin provocar el necrosamiento total de los explantes como ocurrió con la concentración del 30 % de hipoclorito de sodio. La concentración de 10 % de hipoclorito de sodio fue la más óptima para la desinfectación de hojas de *P. compactum*.

Los patógenos que provocaron la contaminación fueron hongos y bacterias no endógenas de la planta ya que no se presentaron al realizar una limpieza adecuada de los materiales ocupados y de la cámara de siembra, así como cuando se realizaba una adecuada desinfestación del material vegetal. Para reforzar las medidas de desinfestación se limpió la superficie de la cámara de cultivo con un limpiador casero comercial bactericida y fungicida, y los frascos Gerber utilizados para el cultivo de los explantes se metieron a autoclave a 121°C a 1.5 kg·cm² de presión durante 30 minutos, se lavaron y se rociaron con alcohol a 70 % antes de hacer uso de ellos. Después de la siembra y de cada cambio de medio, se sellaron con cinta y una recubierta extra

plástica. Estas medidas resultaron positivas ya que mostraron una incidencia de sólo 10 %. Los diferentes tipos de respuesta a los distintos tipo de tratamientos para la desinfestación pueden observarse en la figura 11.

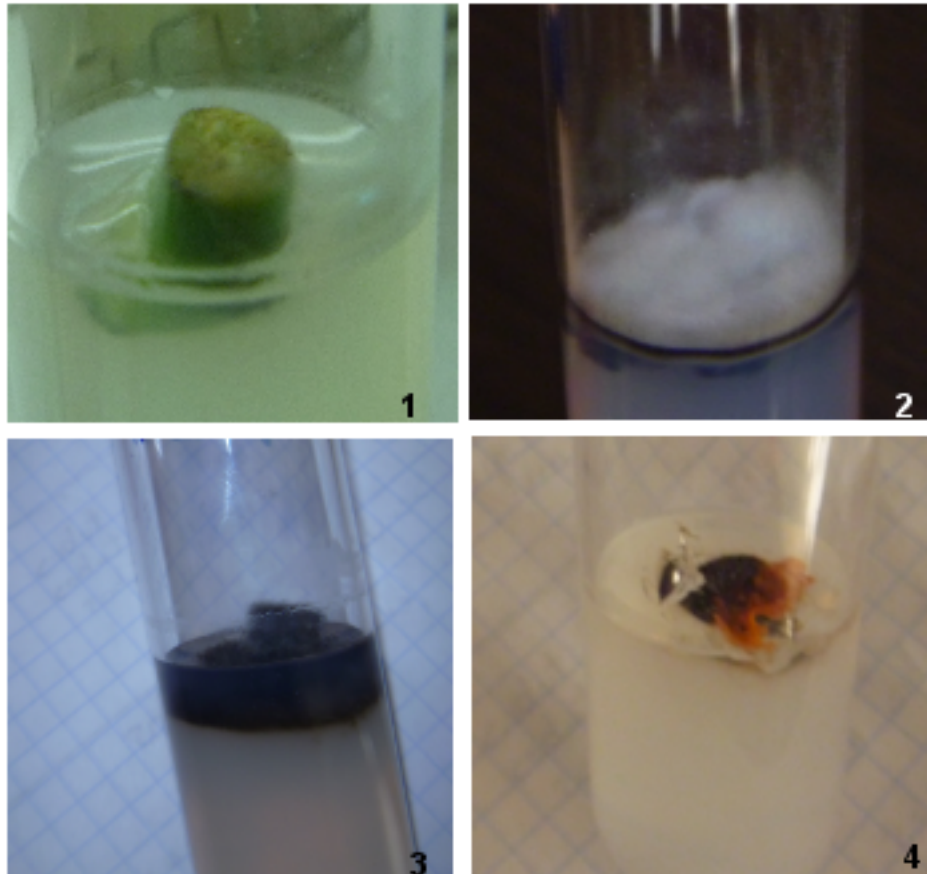


Figura 11. (1) Explantes de hoja de *P. compactum* libres de patógenos. (2) Contaminación fungosa. (3) Necrosamiento de explantes pero libres de patógenos. (4) Contaminación por bacterias al no realizar una adecuada limpieza de la cámara de siembra.

6.3. CONTROL DEL NECROSAMIENTO

El cambio de posición de los explantes en el medio de cultivo donde se contenían no disminuyó el necrosamiento de los explantes, puesto que el necrosamiento fue general en todo el tejido, por lo que los explantes que se ennegrecían, no revertieron el necrosamiento aún en medio fresco. El

necrosamiento de los explantes puede apreciarse en la figura 12, donde se también se contrasta con la apariencia de un explante verde.

La agitación de los explantes fue otra técnica poco exitosa debido a la embebición de agua por parte de los explantes que provocó la partición de estos y por lo tanto, provocó aún mayor necrosamiento después de la siembra.

La adición de antioxidantes al medio de cultivo, con la combinación de ácido cítrico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido ascórbico ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), no mejoró el porcentaje de explantes sin necrosamiento, al presentarse el necrosamiento en 90 % (Cuadro 1).

El carbón activado ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) adicionado al medio de cultivo, redujo el necrosamiento hasta 40 % de los explantes en las pruebas *a priori*, haciéndolo el compuesto probado con mayor efectividad para lograr la obtención explantes verdes. Ayudó a evitar el necrosamiento de varios explantes que lograron desarrollar la brotación de hojas y/o raíz (Cuadro 1).

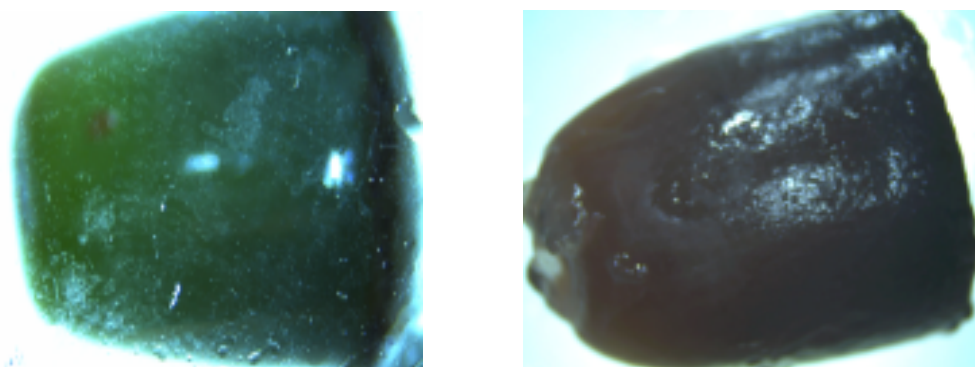


Figura 12. Izq. Apariencia de un explante verde saludable. Der. Apariencia de un explante necrosado.

La disminución del necrosamiento en los explantes se debió a las características del carbón; es decir una alta capacidad de absorción de gases, vapores y sólidos coloidales. Pan y Van Staden (1998) indican que el carbón activado usado en el medio de cultivo tiene una absorción orgánica polar y que muestra una mayor absorción por compuestos aromáticos tales como: fenoles y sus oxidados, auxinas (AIA, ANA, IBA) citocininas (BA) y hormonas.

CUADRO 1. Porcentaje de necrosamiento en explantes de hoja de *P. compactum* tratados bajo distintas estrategias

Tratamiento	Porcentaje de explantes necrosados (%)
Cambio de posición de explante en el medio de cultivo	95
Agitación	95
Acido cítrico ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + ácido ascórbico ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	90
Carbón activado ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)	60 - 70

En estudios sobre compuestos encontrados en diversas especies de *Sedum* de Kazagistan, se encontraron ácidos fenólicos como: gálico, caféico, ferúlico, syringico, gentísico vanílico, o-coumárico (Korul'kin, 2001). Estos estudios dan una importante información sobre los posibles ácidos fenólicos que pudieran encontrarse en otros géneros de la familia Crassulaceae y que podrían estar provocando el necrosamiento de los tejido de los explantes de *P. compactum*.

6.4. SELECCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los explantes cultivados en el medio con las combinaciones de BA y AIA no desarrollaron ningún tipo de respuesta. Sólo algunos de ellos se mantuvieron verdes, mientras que de las combinaciones de TDZ + BA, el tratamiento con $2.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA fue en donde se obtuvo el mayor porcentaje de explantes verdes y explantes con algún tipo de respuesta como: emisión de raíces e iniciación de brotes foliares (Cuadro 2). De este tratamiento se obtuvieron dos plantas completas de 2 cm de longitud. No hubo presencia de tejidos hiperhidratados en ninguno de los tratamientos evaluados.

CUADRO 2. Porcentaje de explantes verdes, con respuesta e hiperhidratados; cultivados bajo distintas combinaciones de Thidiazuron (TDZ), Benziladenina (BA) y Ácido indolacético (AIB)

Tratamiento evaluado	Explantes verdes (%)	Explantes con respuesta (%)	Tejido hiperhidratado (%)
$1.0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB*	2.5	0.0	0.0
$3.0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ BA + $0.3 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB*	0.0	0.0	0.0
$1.2 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.2 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA **	4	4	0.0
$2.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA **	4	28	0.0
$5.0 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $1.0 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA **	2.5	0.0	0.0

* Tomado de una muestra de 39 explantes.

** Tomado de una muestra de 46 explantes.

De acuerdo a los resultados de estas evaluaciones, se seleccionaron con las concentraciones de $2.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.5 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, como las mas óptimas, añadiendo también diferentes concentraciones de sulfato de adenina (SAD) en un intento de mejorar la emisión de brotes foliares y raíces.

Los tratamientos fueron de la siguiente forma como se muestra en el cuadro 3:

CUADRO 3. Tratamientos evaluados

	T0	T1	T2	T3
TDZ ($\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.0	2.5	2.5	2.5
BA ($\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.0	0.5	0.5	0.5
SAD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			80	100

Cada frasco Gerber fue llenado con 30 ml de medio de cultivo, requiriéndose de 900 ml por tratamiento con 30 repeticiones (2.7 L por tratamiento). Se adhirió el carbón activado al medio de cultivo MS en la primera siembra.

6.5. EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO SOBRE LOS EXPLANTES

6.5.1. Regeneración de brotes foliares

De acuerdo a los resultados obtenidos del experimento y del análisis estadístico se determino que en las variables evaluadas: días a emisión de brotes foliares, número de brotes foliares y tamaño de brotes foliares, los diferentes tratamientos no tuvieron evidencia de diferencias estadísticamente

significativa entre ellos, por lo que no el efecto entre tratamientos sobre los explantes es el mismo.

La emisión de brotes foliares en los explantes con respuesta, se dio entre los 15 y 25 días cultivados en todos los tratamientos y en los dos tipos de explantes. La iniciación de los brotes foliares se manifestó como una pequeña protuberancia de color blanco en la base de los explantes. Estas coloraciones blancas aumentaron su ancho, largo, altura, y a la vez se fueron diferenciaron en una masa con brotes de tipo foliar con el paso de los días. La coloración de los brotes cambiaron de blanco a verde a la par del desarrollo de estos. Esta respuesta inicial dada por pequeñas protuberancias en la base de las hojas fue observada también por Naz *et al.* (2009) al propagar *in vitro* *Bryophyllum pinnatum* y *Bryophyllum daigremontianum* con hojas como explante. Con respecto al número de brotes foliares, de acuerdo al análisis estadístico se determinó que no existieron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los efectos de los tratamientos. Por lo cual se puede concluir que el efecto de los reguladores de crecimiento fue el mismo. El número inicial de brotes foliares fue constante para todos los explantes, presentándose sólo una protuberancia inicial, ya sea en la parte apical o en la parte basal de la hoja. Sólo un explante de la parte basal foliar cultivado en el tratamiento uno ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA), presentó cuatro protuberancias iniciales, aunque éste no tuvo un mayor desarrollo posterior en comparación a los demás explantes. El tamaño medido de los brotes foliares desarrollados en los explantes, tanto de la parte apical como de la parte basal de la hoja, tampoco presentó diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$) entre los efectos de los tratamientos. El crecimiento máximo fue de 547.33 mm^3 .

Distintos tipos de respuesta encontrados en los explantes pueden observarse en la Figura 13.

Cabe mencionar que durante los 112 días en que se llevo a cabo el experimento, no hubo desarrollo de tallo.

Para la variable número de días para la emisión de brotes foliares, el tratamiento control con una iniciación de 15 a 30 días tuvo los mismos efectos que el tratamientos uno ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA) con una iniciación de 15 a 22 días, al tratamiento dos ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) con una iniciación de 14 a 22 días; y al tratamiento tres ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) con una iniciación de 7 a 26 días. La iniciación puede estar asociada a la temperatura más que a los reguladores de crecimiento, tal y como lo documentan Sanikhani et al. (2006), quienes trabajando en la regeneración *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana*, reportaron que los brotes iniciales comenzaron a aparecer 30 días después de sembrarlos a $22\pm 1^\circ\text{C}$ y en $25\pm 1^\circ\text{C}$ se aceleró la iniciación entre 7 y 10 días. La temperatura de la sala de incubación (25°C) donde se mantuvieron los explantes cultivados, fue posiblemente la más beneficiosa para la iniciación.

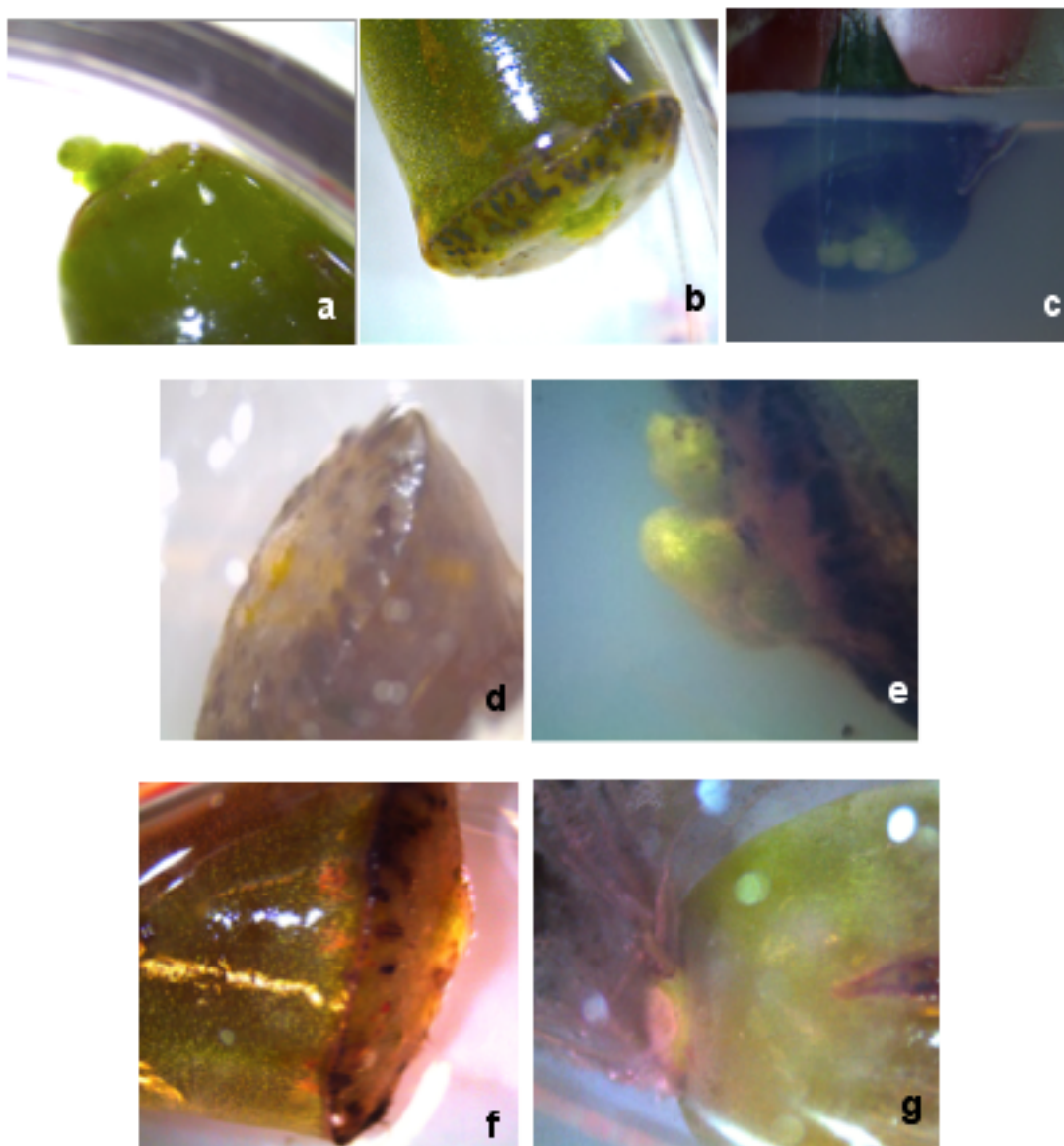


Figura 13. (a) Iniciación de brotes foliares en explantes basales cultivados bajo el tratamiento control. (b) Iniciación de brotes foliares en explantes apicales cultivados bajo el tratamiento control. (c) Iniciación de brotes foliares en explantes apicales cultivados bajo el tratamiento uno. (d) Iniciación de brotes foliares en explantes apicales cultivados bajo el tratamiento dos (TDZ + BA + 80 mg·L⁻¹ sulfato de adenina). (e) Iniciación de brotes foliares en explantes basales cultivados bajo el tratamiento dos. (f) Iniciación de brotes foliares en explantes apicales cultivados bajo el tratamiento tres (TDZ + BA + 100 mg·L⁻¹ sulfato de adenina). (g) Iniciación de brotes foliares en explantes basales cultivados bajo el tratamiento tres (+ 100 mg·L⁻¹ sulfato de adenina).

Para las variables “número de brotes foliares” y “tamaño de brotes”, los reguladores de crecimiento no tuvieron un efecto sobre el número inicial de

brotes ni con el crecimiento máximo registrado de estos. El número inicial de brotes foliares fue de uno para todos los explantes cultivados bajo todos los tratamientos y el tamaño de los brotes fue de 0.5 a 547 mm³ para todos los explantes cultivados en todos los tratamientos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Khan *et al.* (2006), quienes trabajaron con *Kalanchoe tomentosa* para obtener su organogénesis directa, y reportaron que el tratamiento control produjo un mismo desarrollo de brotes foliares que los tratamientos con distintas concentraciones de BA (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/l) y ANA (0.1 y 0.5 mg/l). En cuanto a los efectos obtenidos por el TDZ, los resultados obtenidos son diferentes a los reportados en otros trabajos como los obtenidos con Naz *et al.* (2009), quienes desarrollaron un método de propagación *in vitro* rápida para las crasuláceas *Bryophyllum pinnatum* y *Bryophyllum daigremontianum*, donde el TDZ mejoró notablemente el desarrollo de brotes foliares. Estos mismos efectos fueron reportados por Jaiswal y Sawhney (2006) en *Bryophyllum pinnatum*. Los resultados encontrados en esta investigación, también fueron distintos a los encontrados en otros trabajos como el de Jaiswal y Sawhney (2006), quienes trabajaron con *Kalanchoe pinnata in vitro* y la respuesta de los explantes de segmentos de hoja, reaccionaron desfavorablemente al TDZ (10⁻⁶ M) en el medio de cultivo, encontrando que la diferenciación se redujo a un cuarto, los brotes foliares fueron delgados y albinos en comparación con el tratamiento control, aunque su número se mantuvo constante.

La ausencia de efectos del TDZ, el BA y del sulfato de adenina sobre los explantes, pueden ser debida a que *P. compactum* produce concentraciones suficientes de citocininas endógenas, tal como lo documentan Khan *et al.*

(2006) con *Kalanchoe tomentosa*. Otra causa del efecto nulo de los reguladores de crecimiento pudo haber sido las bajas concentraciones ensayadas, requiriéndose probar concentraciones mayores.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis estadístico correspondientes al número de días a aparición de brotes, número de brotes y tamaño de brotes entre los dos tipos de explantes, se llegó a la conclusión de que no existen diferencias significativas entre los tipos de explantes.

Los explantes apicales cultivados bajo el tratamiento control emitieron respuesta de 16 a 29 días, una protuberancia como respuesta inicial y 12 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar; mientras tanto los explantes basales cultivados bajo este mismo tratamiento emitieron las primeras respuestas de 24 a 30 días, una sola protuberancia como respuesta inicial y un crecimiento máximo de 547 mm^3 . Los explantes apicales cultivados bajo el tratamiento uno ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA) presentaron respuesta de 15 a 22 días, una protuberancia como respuesta inicial y 1.4 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar; los explantes basales cultivados bajo este mismo tratamiento, presentaron respuesta de 15 a 22 días, una protuberancia como respuesta inicial y 1.4 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar; los explantes basales cultivados bajo este mismo tratamiento no tuvieron presencia de desarrollo foliar. Los explantes apicales cultivados bajo el tratamiento dos ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) presentaron respuesta de 26 días, una protuberancia como respuesta inicial y 0.15 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar; los explantes basales cultivados bajo este mismo tratamiento, presentaron respuesta de 14 días, una protuberancia como respuesta inicial y 0.073 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar. Los explantes apicales

cultivados bajo el tratamiento tres ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) presentaron respuesta de 20 a 26 días, una protuberancia como respuesta inicial y 1.5 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar; los explantes basales cultivados bajo este mismo tratamiento, presentaron respuesta de 6 a 7 días, una protuberancia como respuesta inicial y 538 mm^3 de tamaño máximo de masa foliar. El desarrollo máximo de los brotes foliares pueden observarse en las figuras 15 y 16.

Estos resultados pueden deberse a que la concentración interna de citocininas en las hojas es homogénea a lo largo de toda la hoja. Esto está documentado en el trabajo de Jaiswal y Sawhney (2008) donde probaron el crecimiento hipertrófico de discos foliares debido al efecto del TDZ en *Kalanchoe pinnata*. Estos autores encontraron que al hacer discos se delimitaba el estatus de las hormonas endógenas de la planta, por lo que los explantes debían utilizar sólo esa porción de hormonas y sin embargo, todos los explantes fueron capaces de desarrollar brotes foliares. Esta homogeneidad de hormonas endógenas en la planta puede estar asociada al posible sistema de conducción ramificado que se ha observado en las hojas de las crasuláceas, como lo menciona Stout (1938) quien realizó trabajos histológicos en *Kalanchoe rotundifolia*. Sin embargo, no existen trabajos histológicos con *P. compactum*.

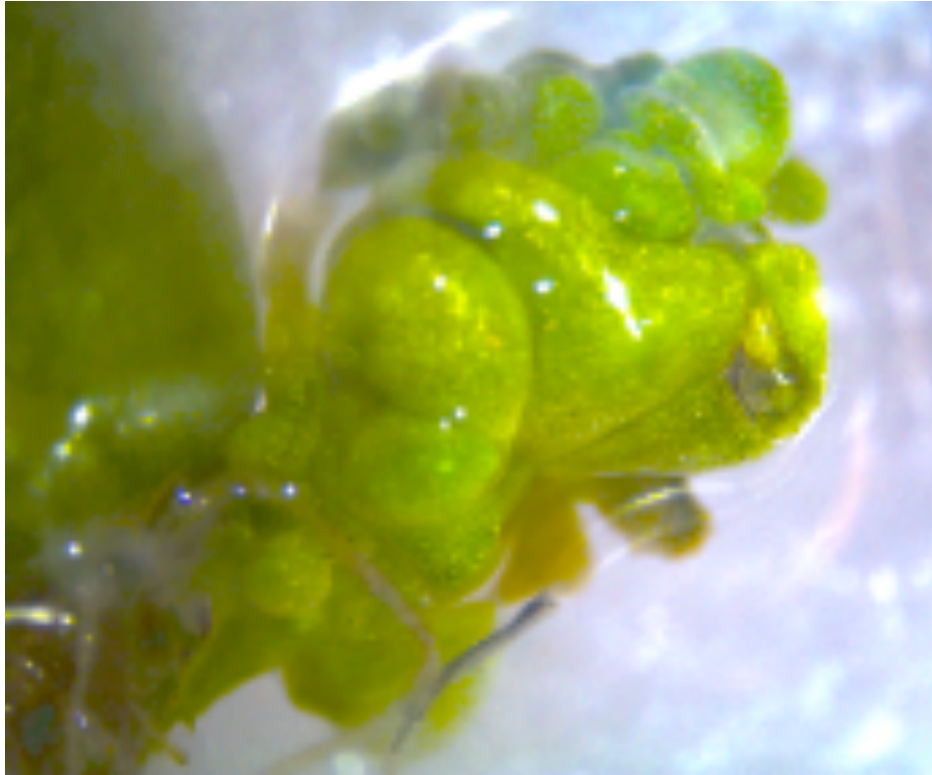


Figura 14. Desarrollo de brotes en explantes basales cultivados bajo el tratamiento control.



Figura 15. Desarrollo de brotes en explantes basales cultivados bajo el tratamiento tres.

La nula necesidad de hormonas en el medio de cultivo para la iniciación y desarrollo de brotes foliares, es una ventaja para la propagación *in vitro* de *P. compactum*, ya que reduce costos, punto siempre deseable en este tipo de propagación.

6.5.2. Regeneración de raíces

El enraizamiento de *P. compactum*, se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo en los que fueron inducidos. En esta variable el análisis estadístico mostró evidencia de que si existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los efectos de los tratamientos, donde los explantes de la parte basal de la hoja cultivados bajo el tratamiento tres ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) fueron los que emitieron raíz en el menor número de días (de 9 a 15 días). Los explantes de la parte basal de la hoja cultivados bajo el tratamiento control mostraron la segunda mejor respuesta (de 7 a 18 días). Además, los explantes cultivados en el tratamiento dos (TDZ + BA + $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) y a los explantes de la parte apical cultivados con el tratamiento control (Figura 17), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, emitiendo raíces a los 14 a 29 días. En los explantes cultivados bajo estos dos últimos tratamientos, también presentaron los menores porcentajes de explantes que mostraron desarrollo de raíz en comparación con los tratamiento control y el tratamiento tres (TDZ + BA + $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) donde se cultivaron los explantes de la parte basal de la hoja.

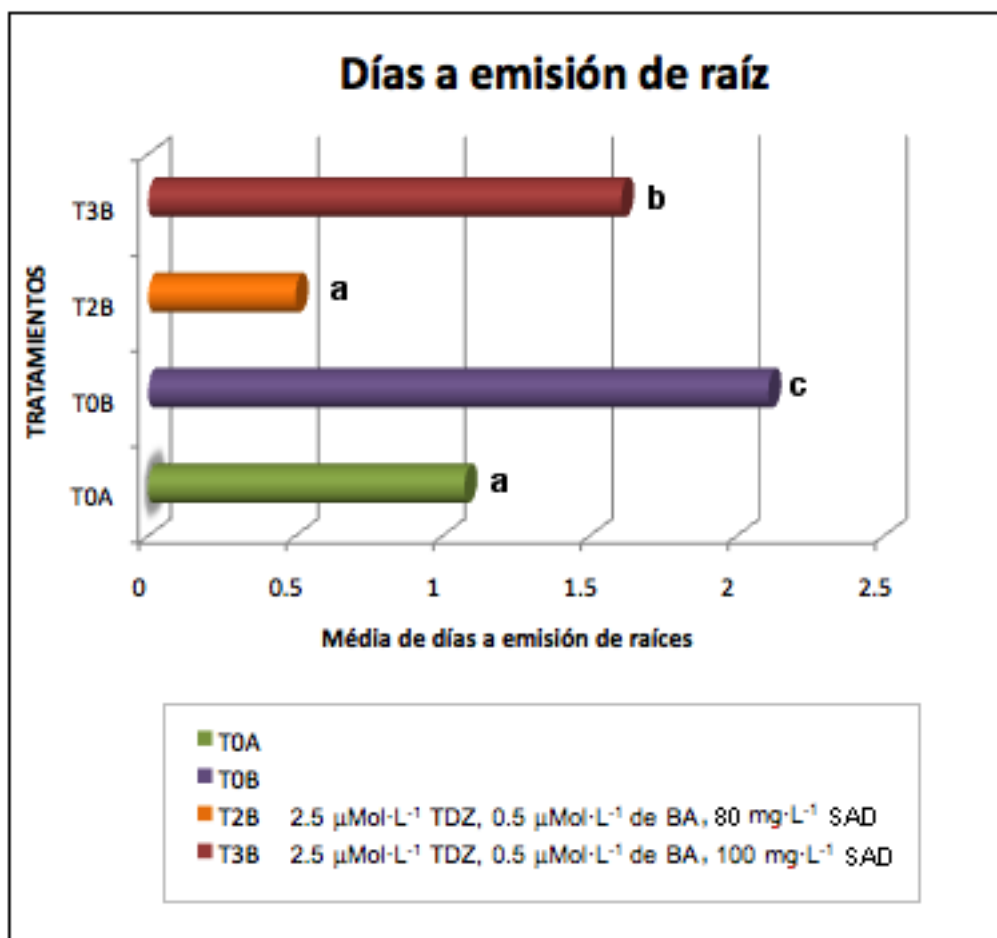


Figura 16. Media de los días a emisión de raíces de los explantes de *P. compactum* basales y apicales con respuesta cultivados en el tratamiento control, tratamientos y tratamiento tres.

Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Los explantes de la parte apical cultivados en los tratamientos uno (2.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, 0.5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA), dos (TDZ + BA + 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) y tres (TDZ + BA + 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD); y los explantes de la parte basal cultivados en el tratamiento uno; fueron incapaces de desarrollar raíces, y por lo tanto, no mostraron evidencias de diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Mientras que si hubo diferencias significativas entre los tipos de explantes, encontrándose las mejores respuesta en los explantes de la parte basal de la

hoja, donde los días a emisión de raíz fueron menos a los días en que los explantes de la parte apical de la hoja llegaron a desarrollar raíz (Figura 18).

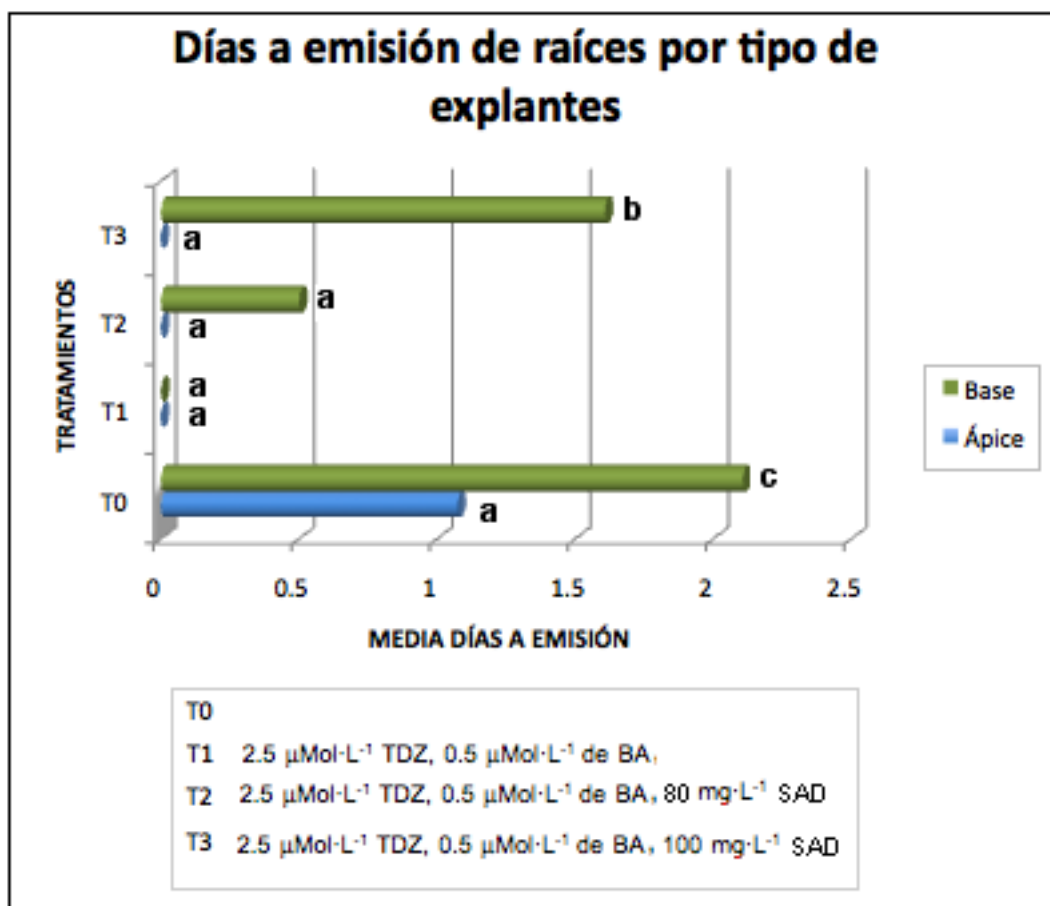


Figura 17. Media de días a emisión de raíces de los explantes apicales y basales cultivados bajo todos los tratamientos. Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

En cuanto al número de raíces, de acuerdo al análisis estadístico, mostró diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos, donde los explantes de la parte basal cultivados bajo el tratamiento tres (TDZ + BA + 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) y el tratamiento control, presentaron un promedio mayor número en el número de raíces, siendo de 3 a 13 y de 8 a 15

respectivamente, en contraste de las dos raíces promedio de los explantes apicales.

Los explantes de la parte basal cultivados bajo el tratamiento dos (TDZ + BA + 80 mg·L⁻¹ SAD) y los explantes de la parte apical cultivados bajo el tratamiento control tuvieron el mismo efecto en cuanto al número de raíces (Figura 19). Estos explantes fueron los que presentaron el menor número de raíces (2 a 6).

Como en el caso anterior, tanto los explantes de la parte apical cultivados en los tratamientos uno (2.5 μMol·L⁻¹ TDZ, 0.5 μMol·L⁻¹ BA), dos (TDZ + BA + 80 mg·L⁻¹ SAD) y tres (TDZ + BA + 100 mg·L⁻¹ SAD); y los explantes de la parte basal cultivados con el tratamiento uno; no presentaron desarrollo radicular y por lo tanto, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$).

Los dos tipos de explantes mostraron diferencias significativas entre ellos, donde los explantes provenientes de la parte basal, desarrollaron un mayor número de raíces que los explantes de la parte apical de la hoja (Figura 20).

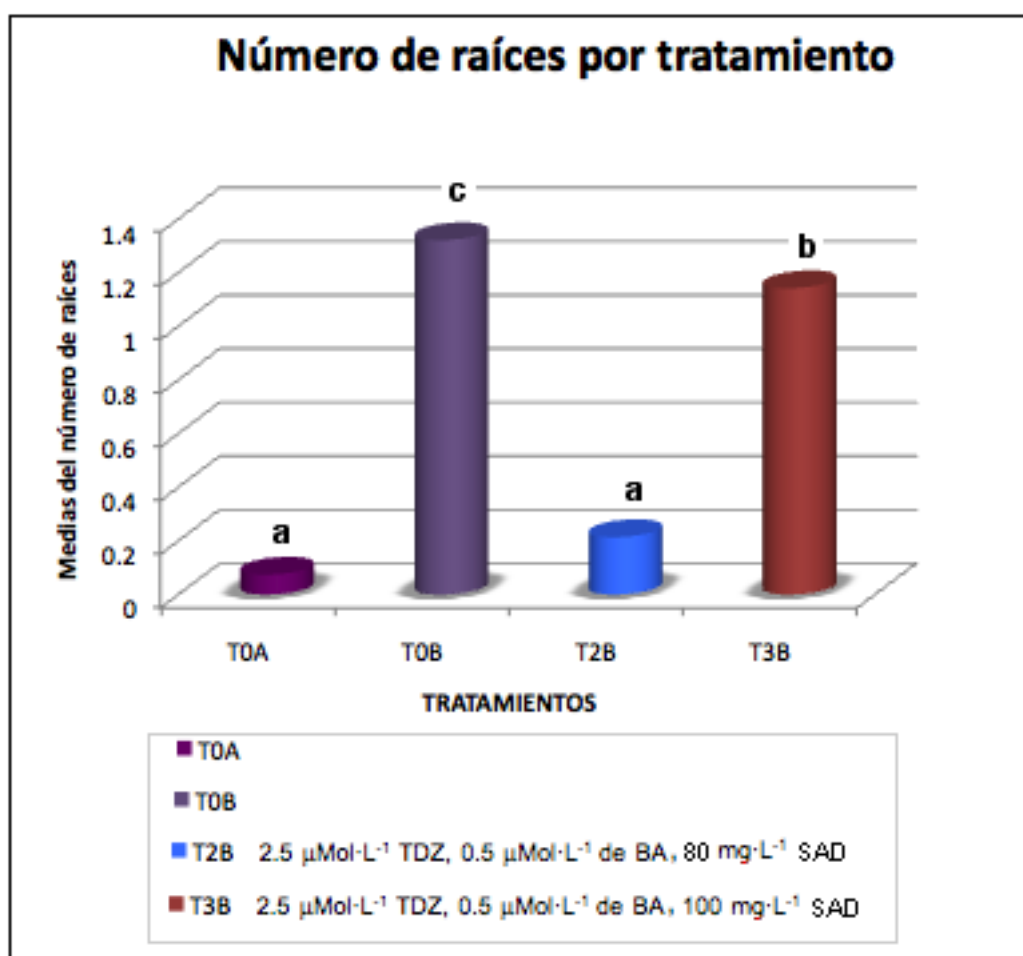


Figura 18. Medias de número de raíces de los explantes de *P. compactum* basales y apicales con respuesta cultivados en el tratamiento control, tratamientos dos y tratamiento tres. Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Referente a la longitud de raíces, el análisis mostró que existieron diferencias significativas entre los seis tratamientos. Los explantes de la parte basal cultivados bajo el tratamiento tres (TDZ + BA + 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) presentaron la mayor longitud promedio de raíces (de 2 a 7 cm), y los explantes de la parte basal cultivados bajo el tratamiento control tuvieron la segunda mayor longitud promedio de raíces (de 4 a 6 cm). Por su parte, los explantes basales cultivados bajo el tratamiento dos (TDZ + BA + 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) y los apicales

cultivados bajo el tratamiento control, presentaron una longitud promedio de 4 cm.

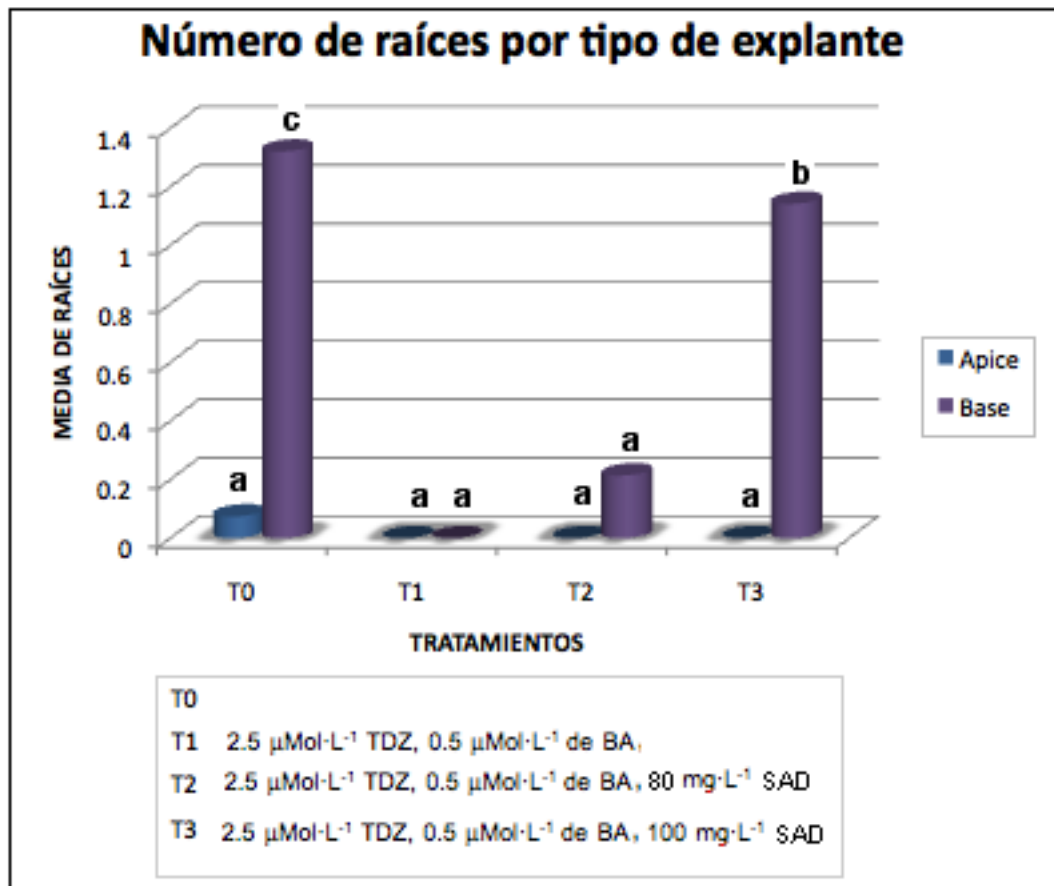


Figura 19. Medias del número de raíces de los explantes apicales y basales cultivados bajo todos los tratamientos. Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Los explantes de la parte apical de la hoja cultivados bajo el tratamiento control fueron los tratamientos con la menor longitud promedio de raíces (4 cm). Estos últimos no mostraron diferencias significativas a 5% (Figura 21).

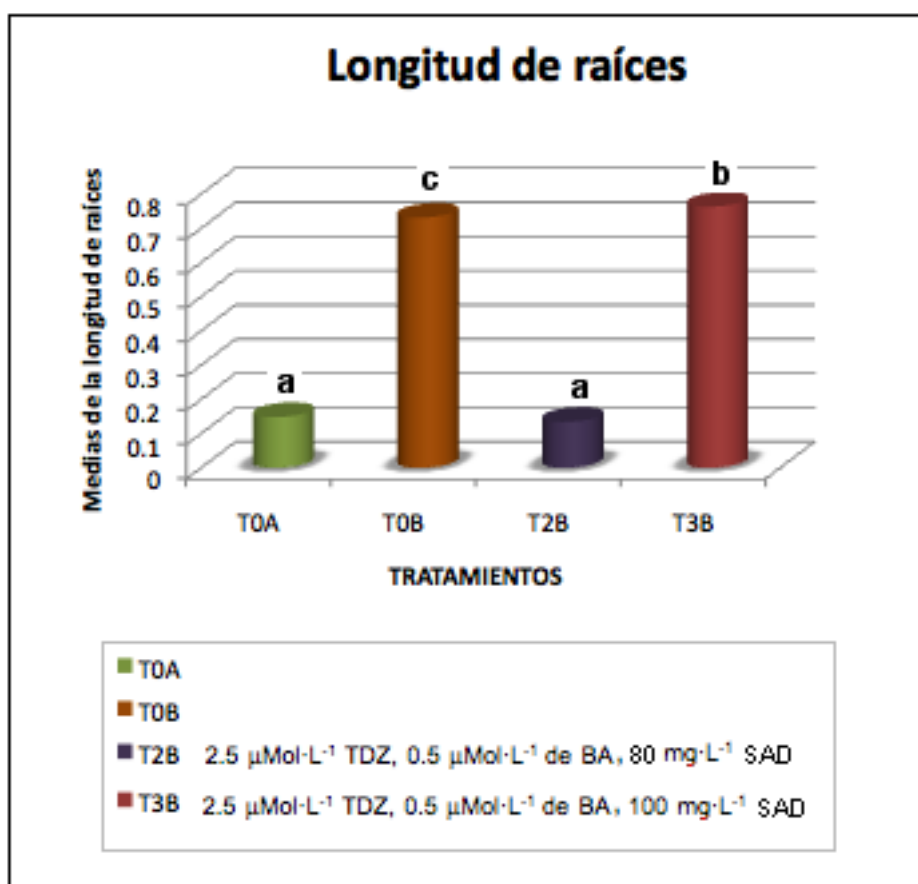


Figura 20. Medias de la longitud de raíces de los explantes de *P. compactum* basales y apicales con respuesta cultivados en el tratamiento control, tratamientos dos y tratamiento tres. Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Como en los casos anteriores, tanto los explantes apicales cultivados en los tratamientos uno ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA), dos (TDZ + BA + $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD) y tres (TDZ + BA + $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SAD); como los explantes basales cultivados en el tratamiento uno ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA) no presentaron desarrollo radicular y por consecuencia no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Los explantes de la parte basal presentaron una mayor longitud radicular en comparación de la longitud de las raíces presentadas en los explantes de la parte apical de acuerdo a los análisis de resultados (Figura 22).

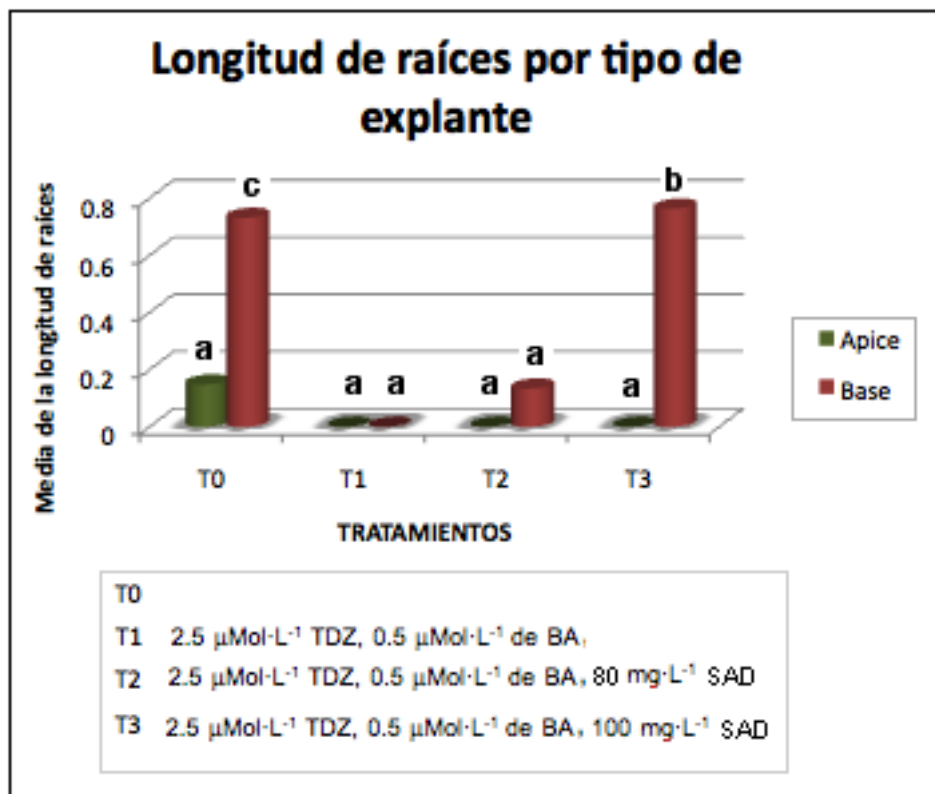


Figura 21. Medias de la longitud de raíces de los explantes apicales y basales cultivados bajo todos los tratamientos. Nota: tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

La diferencia en la regeneración de raíces entre los dos tipos de explantes fue debida a que los explantes provenientes de la parte basal poseen una zona meristemática, por lo que la regeneración de brotes y raíces fue posible sólo con promover esta zona con el medio de cultivo con o sin la presencia de reguladores de crecimiento. Sin embargo, los explantes provenientes de la parte apical, no poseen esta zona meristemática, o al menos, no se tiene

registró en ningún trabajo anterior, por lo que la poca regeneración de raíces en estos explantes puede estar asociada a la ausencia de células en activo crecimiento. Del mismo modo, la baja concentración de auxinas y a la alta concentración de citocininas internas en la hoja, y al antagonismo de estas mismas hormonas con las sintéticas son factores que posiblemente estén impidiendo la regeneración de raíces; lo cual, se puede observar en la tabla 6, donde los explantes de la parte apical de la hoja, si lograron producir algunas raíces en el tratamiento sin hormonas. Este antagonismo hormonal ha sido bien documentado en diversos trabajos, como el de Sanikhani *et al.* (2006), quienes encontraron que las auxinas endógenas de las hojas de *Kalanchoe blossfeldiana* fueron una barrera para la regeneración de brotes foliares; o el trabajo de Naz *et al.* (2009), donde encontraron que bajas concentraciones de TDZ en el medio de cultivo favoreció el desarrollo de brotes foliares y de raíces, obteniendo hasta 100 raíces en concentraciones de 10 μ M de TDZ. El efecto negativo de las hormonas externas también lo mencionan Sanikhani *et al.* (2006), donde altas concentraciones de TDZ en el medio de cultivo, inhibió la iniciación de raíces y los días de enraizamiento de las plantas en hojas de *Kalanchoe blossfeldiana* hasta 22 días. El BA también ha sido reportado por Naz *et al.* (2009) como un inhibidor del enraizamiento en el cultivo *in vitro* de las crasuláceas *Bryophyllum pinnatum* y *Bryophyllum daigremontianum*. No hay documentación previa de los efectos del sulfato de adenina sobre la iniciación y el número de raíces en la propagación *in vitro* de crasulácea, pero se sabe que a pesar de que promueve el alargamiento celular y favorece la iniciación de brotes foliares, también se ha encontrado que reduce la formación de raíces. Esto lo han reportado Skoog y Tsui, 1948 en tabaco al

propagarlo *in vitro*, Wiggans (1954) trabajando *in vitro* con concentraciones arriba de 200 mg/l de sulfato de adenina en zanahoria.

El número de días para el enraizamiento dependió tanto del tipo de explante como de los reguladores de crecimiento. Los explantes de la parte apical de la hoja también se vieron mas afectados, en todos los tratamientos, por los reguladores de crecimiento, ya que como con el caso del desarrollo de raíces, altas concentraciones de TDZ y de BA retardan el número de días a iniciación radicular.

En los explantes de la parte basal de la hoja, existieron efectos benéficos por parte de los reguladores de crecimiento al proveer al meristemo encontrado en estos, de condiciones óptimas para diferenciarse. Esto pudo apreciarse en el tratamiento con $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de adenina, donde los explantes emitieron raíz 7 a 18 en contraste con los 14 a 18 días de los explantes basales cultivados en el tratamiento control.

Lograr el enraizamiento en los explantes apicales esta asociado al intrincado sistema vascular de las hojas que aparentemente poseen, ya que provee de hormonas endógenas, asegura la buena hidratación del explante, la toma de nutrientes y de hormonas del medio de cultivo, sin embargo, el balance y tipo de hormonas en el medio para lograr el enraizamiento de todos los explantes que provengan de la parte apical de la hoja, aun es un factor que requiere de mayor estudio.

El desarrollo de raíces en distintos explante de *P. compactum* cultivados bajo los distintos tratamientos pueden observarse en la Figura 22.

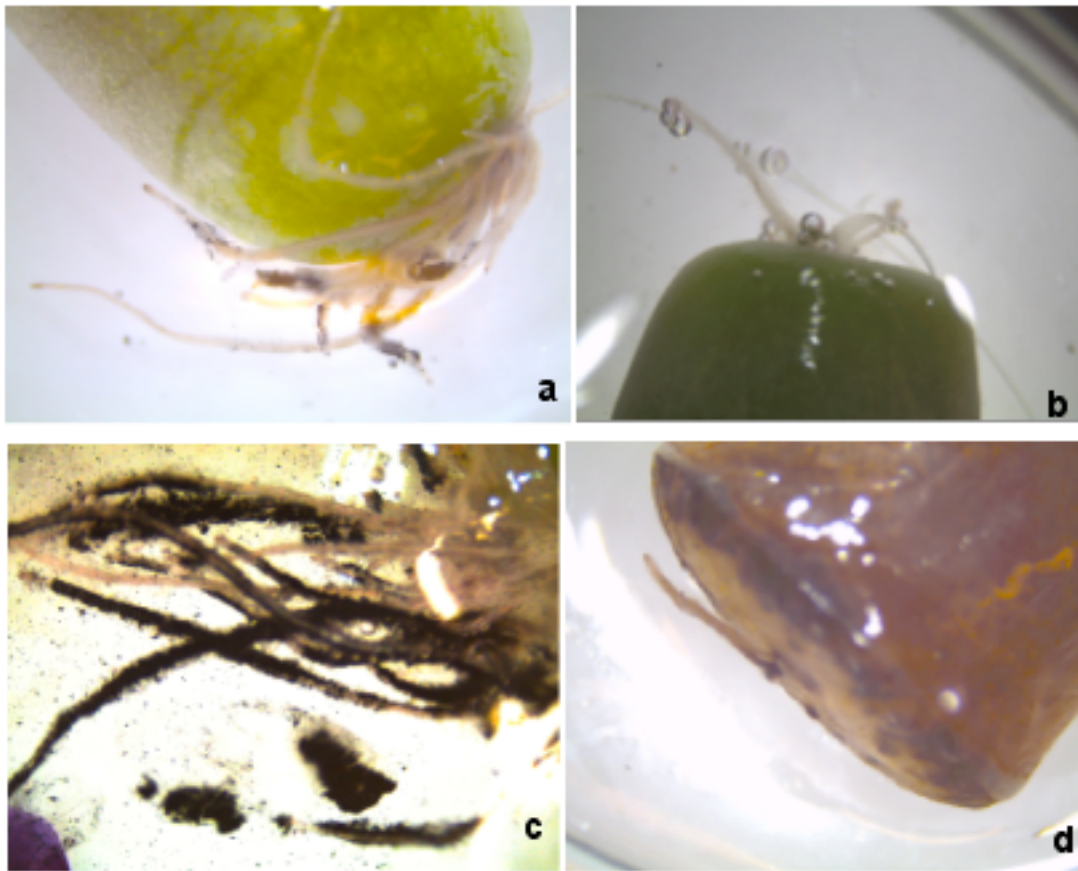


Figura 22. (a) Desarrollo radicular de explantes de la parte basal de la hoja cultivados con el tratamiento control. (b) Desarrollo radicular de explantes de la parte basal de la hoja cultivados bajo el tratamiento dos ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ + $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de adenina). (c) Desarrollo radicular de explantes de la parte basal de la hoja cultivados bajo el tratamiento tres ($2.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ + $0.5 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de adenina). (d) Desarrollo radicular de explantes de la parte apical de la hoja cultivados bajo el tratamiento control.

La longitud de las raíces no depende en su totalidad por la acción de los reguladores de crecimiento, ya que aunque los explantes basales cultivados en el tratamiento tres (TDZ + BA + $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SAD) si tuvieron una longitud mayor que los explantes basales cultivados en el tratamiento control, estos últimos también presentaron gran longitud, lo que podría indicar que no

es necesario la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo si el objetivo es una mayor elongación de raíces. Estos resultados son similares a los obtenidos por Khan *et al.* (2006) propagando *Kalanchoe tomentosa in vitro*, en las diversas concentraciones de BA, pero contrarios a lo encontrado por Naz *et al.* (2009) que indican efectos positivos del TDZ y del BA sobre la longitud de raíces en explantes de hoja de *Bryophyllum pinnatum* y *Bryophyllum daigremontianum*, con concentraciones mayores a los 5 de $\mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ y combinando el BA con auxinas como el ácido naftalenacético (ANA). Sin embargo, se requiere de mayores estudios sobre la acción de los reguladores de crecimiento y concentraciones sobre la longitud radicular en *P. compactum*.

6.6. EFECTOS DEL CARBÓN ACTIVADO

El carbón activado, incluido en el medio de cultivo, podría tener efectos positivos sobre la iniciación de y desarrollo de brotes foliares y raíces en los explantes de *P. compactum*. Pan y Van Staden (1998) mencionan que la característica del carbón activado de absorber los reguladores de crecimiento es benéfico cuando las concentraciones de los reguladores deben ser muy bajas. Esto puede ser de utilidad en la familia Crassulaceae donde se ha reportado que las concentraciones bajas de los reguladores favorece a la organogénesis de estas plantas como lo mencionan Kahn *et al.* (2006). Dumas y Monteuis citados por Pan y Van Staden (1998) encontraron que durante el enraizamiento *in vitro* de brotes micropropagados de *Pinus pinaster* con carbón activado mejoró el potencial de raíces adventicias en número y

longitud. El efecto estimulante del carbón activado en el enraizamiento fue particularmente asociado con explantes maduros. Todas estas características podrían indicar que el carbón activado pudo haber tenido algún efecto sobre la iniciación en los explantes de *P. compactum*, sin embargo, se requiere de mayor investigación al respecto, analizando de manera independiente los efectos del carbón activado sobre el desarrollo de brotes foliares y raíces en explantes de *P. compactum*.

6.7. TIEMPO DE REGENERACIÓN A PLANTAS COMPLETAS

Los explantes logrados en la presente investigación, en el laboratorio de cultivo de tejidos del departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, se desarrollaron a una planta completa de 2.0 cm en un tiempo de 7 meses, como se observa en la figura 23. Estas plántulas se sumergieron en Captan ®, se plantaron en vasos conteniendo suelo estéril y se recubrieron con plástico como inicio de aclimatación a invernadero (figura 24) . El estímulo del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento, reduce los tiempos de desarrollo a una planta completa.

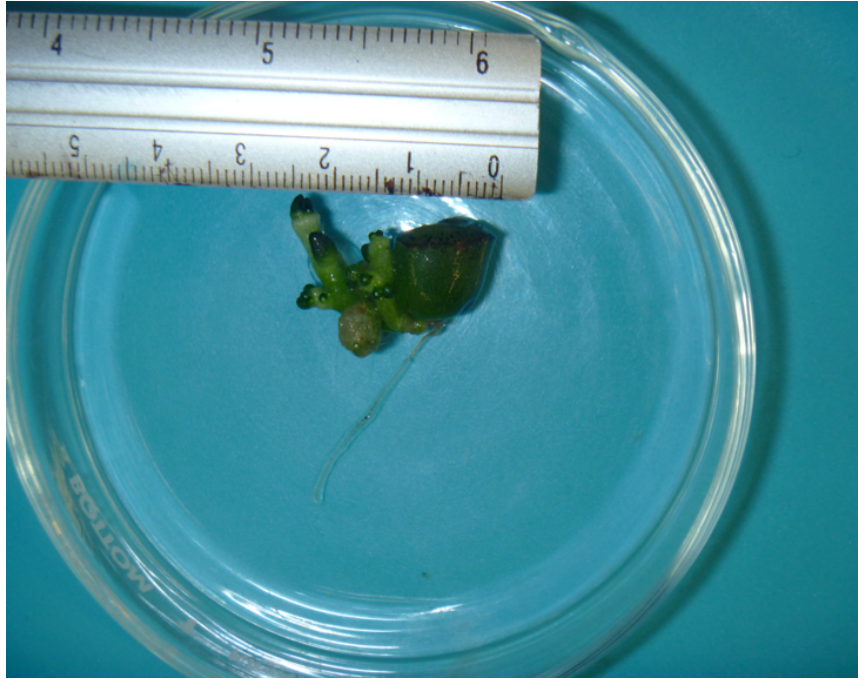


Figura 23. Plántula regenerada a partir de un explante basal de hojas de *P. compactum*. El crecimiento de 2.5 cm se obtuvo en un lapso de 7 meses.



Figura 24. Inicio de aclimatación de plántulas regeneradas a partir de un explante basal de hojas de *P. compactum*.

7. CONCLUSIONES

- ✧ Los resultados obtenidos en esta investigación, son un parteaguas para un método sencillo y eficiente para lograr la multiplicación masiva *in vitro* *P. compactum* en cultivo *in vitro*, donde se describió la posibilidad de la regeneración de plántulas nuevas a partir de hojas y con o sin el uso de thidiazurón, benziladenina y sulfato de adenina.
- ✧ Si es posible la propagación *in vitro* de *Pachyphytum compactum* mediante la organogénesis directa.
- ✧ El medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) a 100%, suplementado con 3% de sacarosa, 100 mg x L⁻¹ de mio-inositol, y 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina, 0.8% de agar, con pH ajustado a 5.7 ± 0.1, sin reguladores de crecimiento; fue el mejor medio para la iniciación y regeneración de brotes foliares en explantes de hoja de *Pachyphytum compactum*, al desarrollar el mismo porcentaje de brotes foliares que los medio MS con Thidiazuron, benziladenina y sulfato de adenina, pero ahorrando en el costo de los reguladores de crecimiento.
- ✧ Las concentraciones de 2.5 µMol·L⁻¹ de TDZ + 0.5 µMol·L⁻¹ de BA + 100 mg·L⁻¹ de sulfato de adenina, favorecen la iniciación y el número de raíces en explantes de *Pachyphytum compactum* con meristemo.

- ✧ Los días a iniciación de brotes foliares esta directamente relacionado con el aumento de la temperatura, siendo mayor esta, más rápida la iniciación.
- ✧ Las hojas de *Pachyphytum compactum* podrían producir suficientes auxinas y citocininas endógenas para desarrollar crecimiento foliar, sin embargo, esto requiere de mayor investigación.
- ✧ Se requiere de mayores pruebas de concentraciones y los efectos individuales del thidiazurón, benziladenina, sulfato de adenina y carbón activado para determinar su efecto sobre la iniciación, crecimiento y diferenciación de brotes foliares en *Pachyphytum compactum*.
- ✧ El medio de cultivo óptimo para el enraizamiento depende del tipo de explante, requiriéndose mayor investigación sobre los efectos individuales del Thidiazurón, Benziladenina, sulfato de adenina y el carbón activado sobre los explantes que no cuentan con meristemo.
- ✧ El control del necrosamiento en los explantes de *Pachyphytum compactum* en el cultivo *in vitro* requiere de mayor investigación.
- ✧ El efecto del carbón activado sobre el desarrollo de hojas y raíces en los explantes de *Pachyphytum compactum* en el cultivo *in vitro* requiere de mayor investigación.

- ✧ Se requiere realizar investigaciones sobre los compuestos encontrados en *Pachyphytum compactum* para poder determinar con precisión los causantes del necrosamiento de los explantes.

- ✧ Se requieren estudios histológicos y anatómicos en hojas de *Pachyphytum compactum* para poder determinar con exactitud que células podrían estar favoreciendo el desarrollo de crecimientos en la sección media de estas.

8. LITERATURA CITADA

ABDELNOUR-ESQUIVEL A.; ESCALANT, J. V. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Bibl. Orton IICA/CATIE. Costa Rica. 46 p.

ALIYU, B. S.; MUSTAPHA, Y. 2007. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus – indica*) explants. African Journal of Biotechnology. 6 (11): 1330 – 1331

AMOO, S. O.; FINNIE J. F.; VAN STADEN, J. 2009. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: ab ebdabgered medicinal and ornamental succulent. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 96:273-278

APEZTEGUÍA, C. R. R.; RODRÍGUEZ L. G. 1999. Cactus y Otras Suculentas en Cuba. Ed. Científico – Técnica. La Habana, Cuba. 213 p.

ÁVILA, S. M.; G. DE LA ROSA A.; REYES, S. J. 2005. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, La colección de crasuláceas (siemprevivas). *Floral*. XV (1): 14 – 16.

CALVA, C. G.; PÉREZ V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6 (11): 1 – 16

CHOREÑO-TAPIA, J. M.; GONZÁLEZ-ROSAS H.; TERRAZAS-SALGADO T.; HERNÁNDEZ-LIVERA A. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus*

seniles Haworth Pfeiffer a partir de areólas. Revista Chapingo Serie Horticultura. 8(2):183-196.

CLAYTON, P. W.; HUBSTENBERGER J. F.; PHILLIPS G. C. 1990. Micropropagation of members of the cactaceae subtribe cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2):337-343.

EGGLI, U. 2003. Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae. Ed. Springer. Berlín, Alemania. 458 p.

FAY, F. M.; GRATTON, J. 1999. *In Vitro* propagation of succulent plants: In: Plant Cell Culture Protocols. R. D. Hall (Ed). Vol III. Humana Press Inc, Totowa, NJ Pp. 135 – 140

HAAGE, W. 1963. Cacti and Succulents: A practical Handbook. Vista Books. Londres, Gran Bretaña. 263 p.

HAWKINS, T. S.; SCHIFF, N. M.; GARDINER, E. S.; LEININGER, T.; DEVALL, M. S.; WILSON, D.; HAMEL, P. 2007. Micropropagation of the endangered shrub pondberry (*Lindera melissifolia* [Walt.] Blume). Hort. Science. 42(2):407-409.

JAISWAL, S.; SAWHNEY, S. 2006. Modulation of TDZ-induced morphogenetic responses by anti-auxin TIBA in bud-bearing foliar explants of *Kalanchoe pinnata*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 86:69-76

KHAN, S.; NAZ, S.; ALI, K.; ZAIDI, S. 2006. Direct organogénesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot – tips. Pak. J. Bot. 38(4):977-981.

KORUL'KIN, D. Y. 2001. Chemical composition of certain *Sedum* species of Kazakhstan. Chemistry of Natural Compounds. 37(3):219-223.

QUIALA E.; MONTALVO G.; MATOS J. 2004. Empleo de la biotecnología para la propagación de cactáceas amenazadas. Biotecnología vegetal. 4(4):195-199.

LAWRENCE, H. M. G. 1951. Taxonomy of Vascular Plants. The Macmillan company, Inc. Estados Unidos de América. 823 p.

LIAO, Z.; CHEN M.; SUN X.; TANG K. (2006) Micropropagation of endangered plant species: *In*: Plant Cell Culture Protocols. LOZOYA-VARGAS V.; VÁZQUEZ-FLOTA F. (Eds). Humana Press Inc. Segunda Ed. Yucatán, México. 430 p.

MACDONAL, B. 1986. Practical Woody Plant Propagation for Nursery Growers. Vol. 1. Timber Press. Portland, Oregon, Estados Unidos de América. 669 p.

MARTÍNEZ, M. 1969. Las Plantas Medicinales de México. Quinta edición. Botas editorial. México, D.F. 656 p.

MATOS A.; MOLINA J.; ACOSTA D. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. CIENCIA 8(3): 280-284

MEYRÁN, G. J. 1988. La clasificación genérica de las crasuláceas mexicanas. Cact. Suc. México. 23 (4): 79 – 88.

MEYRÁN, G. J. y L. LÓPEZ C. 2003. Las crasuláceas de México. Sociedad Mexicana de Cactología A. C. D.F. México. 234 p.

MIKULÍK, J. 1999. Propagation of endangered plant species by tissue cultures. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis. Biol. 37:27-33.

MURASHIGE, T.; F., SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.

NAZ, S.; JAVAD, S.; ILYAS, S.; ALI, A. 2009. An efficient protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum daigremontianum*. Pak. J. Bot. 41(5):2347-2355.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture. A review. Plant Growth Regulation. 26:155-163.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; DÁVILA-FIGUEROA. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae) . In vitro Cell. Dev. Biol. 38: 73 -78

PORTER, C. L. 1967. Taxonomy of Flowering Plants. Segunda edición. Freeman. Estados Unidos de America. 472 p.

RAMÍREZ-MALAGON, R.; AGUILAR-RAMÍREZ, I.; BORODANENKO, A.; PÉREZ-MORENO, L.; BARRERA-GUERRA, J. L.; NUÑEZ-PALENIUS H. G.; OCHOA-ALEJO, N. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 43:660-665

RZEDOWSKI, G. C. de.; J. RZEDOWSKI. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. Segunda ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.

ROST, L. T. 1969. Vascular pattern and hydathodes in leaves of *Crassula argentea* (Crassulaceae). Botanical Gazette. 130(4):267-270

RODRÍGUEZ, L. J. 2007. Cultivo y Propagación Convencional de 26 especies de la Familia Crassulaceae con Potencial Ornamental. Tesis para la obtención del grado de licenciatura como ingeniero agrónomo especialista en fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 204 p.

SAGARPA. 2004. La floricultura en México. www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2004/marzo/B060.htm. Consultado 05 de abril 2012.

SANIKHANI, M.; FRELLO, S.; SEREK, M. 2006. TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoë blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 85:75-82.

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Ecológica. Tomado en marzo de 2012 de: www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Pages/nomsxmateria.aspx

SKOOG, F; TSUI, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. American Journal of Botany. 35(10):782-787.

STOUT, N. H. 1938. Gemmipary in *Kalanchoe rotundifolia* and other Crassulaceae. American Journal of Botany. 25(2):106 – 110.

VILLALOBOS, A. V. M.; THORPE T. A. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales: *En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A (Eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Segunda impresión. Cali, Colombia. Pp. 135 – 149

VILLALOBOS V. M.; MEJÍA M. J. M.; ESCOBAR A. H. A. (1993) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales: *En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A (Eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Segunda impresión. Cali, Colombia. Pp. 642 – 649

WIGGANS, S. C. 1954. Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. American Journal of Botany. 41(4):321-326.

ZYCH, M.; FURMANOWA, M.; KRAJEWSKA-PATAN, A.; LOWICKA, A. DGREGER, M.; MENDLEWSKA S. 2005. Micropropagation of *Rhodiola kirilowii* plants using encapsulated axillary buds and callus. Acta Biologica Cracoviensia. 47(2):83-87.

APÉNDICE

Compuesto	Mg/l
NH₄NO₃	1650.00
KNO₃	1900.00
CaCl₂	333.00
MgSO₄	181.00
KH₂PO₄	170.00
KI	0.830
H₂BO₃	6.200
MnSO₄·H₂O	16.900
ZnSO₄·7H₂O	8.600
Na₂MoO₄·2H₂O	0.250
CuSO₄·5H₂O	0.025
CoCl₂·6H₂O	0.025
FeHaEDTA	6.200
FeSO₄·7H₂O	27.80
Na₂EDTA	4.123
Myo-inositol	100
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1
Sacarosa	30 g
Agar	7 g

Cuadro 1. Constituyentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS)