

Micropropagación y enraizamiento *ex vitro* de *Beaucarnea hookeri* (LEM.) Baker

María del Rosario Chávez-Muñoz¹
Gregorio Arellano-Ostoa^{1,§}
Yolanda Leticia Fernández Pavía¹
María de los Ángeles Rodríguez-Elizalde²
Eulalia Edith Villavicencio-Gutiérrez³
Héctor González Rosas¹

1 Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura-Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (chavezmmr@gmail.com; mapale1@colpos.mx).

2 Universidad Autónoma Chapingo-Departamento de Fitotecnia. Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (roelyma@gmail.com).

3 Campo Experimental Saltillo-INIFAP. Saltillo, Coahuila. CP. 25315. (villavicencio.edith@inifap.gob.mx).

Autor para correspondencia: arellano@colpos.mx.

Resumen

Beaucarnea hookeri, es una especie endémica de México y está catalogada como amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Con la finalidad de micropropagar esta especie, se estableció un experimento en el *Campus* Montecillo, Colegio de Posgraduados en 2022, donde se evaluó la respuesta de los brotes durante la multiplicación *in vitro* con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y su capacidad de enraizamiento *ex vitro* durante su aclimatización. Se estableció un experimento con tres subcultivos subsecuentes (SC3, SC4, SC4-1), en SC3 se utilizaron brotes generados con 0.5 mg L⁻¹ de BAP (SC2), en SC4 brotes sanos generados del SC3 y SC4-1 con brotes del SC3, pero, con hiperhidratación inicial (HHI). En el SC3 se evaluaron 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg L⁻¹ de BAP. En el SC4 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP y en SC4-1 concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP. Durante la aclimatización se evaluaron cuatro tratamientos de Radix[®] 10 000 (0, 1 000, 2 000 y 4 000 mg kg⁻¹) y se utilizaron brotes del SC2. Durante la multiplicación se registró el número de brotes (NB) y el SC3 generó 6.35 brotes con la concentración 1.5 mg L⁻¹ BAP, con presencia de HHI. En el SC4 se obtuvo 9.7 brotes en promedio y en SC4.1, 5.3 brotes, ambos subcultivos con 0.5 mg L⁻¹ de BAP. Además, en el SC4-1 hubo recuperación de HHI. En el enraizamiento no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo a 80 días del trasplante generó 73.3% de brotes con raíz (SBR). Únicamente los brotes del tratamiento testigo en multiplicación presentaron raíces lo que permite obtener plantas completas en 30 días.

Palabras clave:

Calibanus hookeri, cultivo *in vitro*, Nolinaceae, organogénesis, peligro de extinción.

Introducción

Beaucarnea hookeri sinonimia de *Calibanus hookeri* es endémica de México, se encuentra registrada en Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (De-Nova *et al.*, 2018; Hernández-Sandoval, 2020), crece en afloramientos de rocas ígneas y rara vez sobre rocas calizas. Es un miembro distintivo de la familia Nolinaceae, su morfología que lo distingue es su caudex casi esférico de 0.4 a 1 m de diámetro, corteza fisurada de color marrón grisáceo, hojas dispuestas en rosetas casi sésiles distribuidas en el caudex dando una apariencia cespitosa, las hojas con láminas cóncavas, de 60 a 95 cm de largo y márgenes denticulados.

Presenta inflorescencias paniculadas, de 20 a 40 cm de largo, flores estaminadas sobre pedicelos de 2.5 mm de largo, flores pistiladas de 1 a 1.5 mm de diámetro, frutos casi esféricos a piriforme de 5 a 8 mm de diámetro, pericarpio engrosado y con tres costillas a lo largo del mismo, semillas de 3 a 4 mm de largo y de 3 mm de ancho, de color marrón (Martínez *et al.*, 2014; Hernández-Sandoval, 2020). *Calibanus hookeri* quedó incluido formalmente dentro de *Beaucarnea* derivado del estudio realizado por Rojas-Piña *et al.* (2014). Hernández-Sandoval (2019) señaló que es uno de los géneros que quedaron registrados como sinónimo de *Beaucarnea* en la familia Nolinaceae. En el DOF (2019) en su anexo normativo III, establece que la especie *Beaucarnea hookeri* (Lem.) Baker, es la que comúnmente se le conoce como 'inaja' y 'sacamecate' (Hernández-Sandoval, 2020).

Las sinonimias reconocidas son *Calibanus caespitosus*, *Calibanus hookeri*, *Dasyllirion caespitosum*, *Dasyllirion hartwegianum*, *Dasyllirion hookeri* (DOF, 2019). De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, es una especie en categoría de riesgo 'amenazada' (SEMARNAT, 2010). Al respecto Hernández-Sandoval (2020) reportó a *Calibanus hookeri* como una especie que se encuentra en lugares muy localizados y en poblaciones con pocos individuos, por lo que se considera como amenazada y en peligro de extinción.

Para la conservación de esta especie recientemente, Núñez *et al.* (2021) desarrollaron un protocolo de establecimiento *in vitro* en medio MS suplementado con citocininas a altas concentraciones (2.5, 5 y 7 mg L⁻¹) como bencilaminopurina (BA), cinetina (K), isopentil adenina (2ip) y tidiazuron (TDZ), donde determinaron que el tratamiento más eficiente fue con 5 mg L⁻¹ BA, esta concentración indujo 26 brotes por plántula, aunque también mencionan que presenta susceptibilidad a la hiperhidratación.

En estudios realizados en la etapa de multiplicación, Gil *et al.* (2019) reportaron en *Cattleya trianae* que los tratamientos con la citocininas (6-BAP) aumentaron la respuesta en brotes y disminuyeron la formación de raíces. Waly *et al.* (2018) evaluaron el efecto del tipo de medio y la concentración de BAP en la etapa de multiplicación de *Beaucarnea recurvata* y concluyeron que para la producción de grandes cantidades de plantas debe de usarse el medio B5 suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de BAP por cuatro semanas. El objetivo del presente trabajo fue determinar los mejores tratamientos con concentraciones bajas de BAP para la multiplicación *in vitro*, así como evaluar el enraizamiento *ex vitro* durante la aclimatización de las plantas generadas a partir de su cultivo.

Materiales y métodos

Semillas

Fueron colectadas en el mes de octubre de 2019 en el jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM, México y donadas por el MC Marcial Pineda encargado del mencionado jardín quien realizó la identificación de la planta. Las semillas se almacenaron durante 14 meses en un lugar seco y sin ningún tratamiento dentro de las instalaciones del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México.

Desinfestación de semillas

Consistió en la selección cualitativa después de eliminar la testa (con base al color de la semilla), se eliminaron las semillas de color verdoso y grisáceo para evitar la presencia de hongos y daño mecánico. Una vez que se tuvieron 150 semillas, se colocaron en un vaso de precipitado que contuvo una solución 10 g L^{-1} de detergente biodegradable Roma® y agua del grifo, el vaso se situó durante 30 min a la caída del agua del grifo y al término del tiempo se enjuagaron tres veces. Posteriormente se añadió alcohol al 70% v/v por 1 min y se enjuagó con agua del grifo (tres veces consecutivas), después se usó una solución de hipoclorito de sodio al 30% v/v con dos gotas de tween 20® por cada 100 ml de solución durante 30 minutos.

Antes de completar los 30 min, se llevó a la campana de flujo laminar previamente sanitizada, donde se eliminó la solución de cloro y se enjuagaron cinco veces las semillas con agua desionizada y esterilizada en forma consecutiva, finalmente se utilizó una solución de ácido sulfúrico 4N y se agregó a las semillas por un lapso de 5 min, al término del tiempo se realizaron cinco enjuagues de forma consecutiva con agua desionizada y esterilizada, posteriormente se escurrió el agua del vaso de precipitado y las semillas estuvieron listas para sembrarse en los tubos de ensayo.

Siembra de semillas y medio de cultivo

Se sembró en tubos de ensayo con 20 ml de medio base MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con 2 mg L^{-1} de glicina, 100 mg L^{-1} de myo-inositol, 0.4 mg L^{-1} de tiamina-HCl, 0.5 mg L^{-1} de ácido nicotínico, 0.5 mg L^{-1} de piridoxina HCl, 30 g L^{-1} de sacarosa y 8 g L^{-1} de agar Merk^l. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1N o HCl 0.1N y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg cm^{-2} durante 15 min.

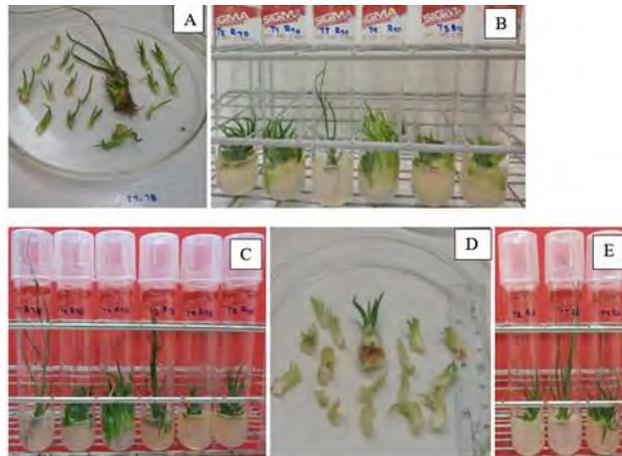
El medio MS se usó para todos los subcultivos, lo que cambió fue la cantidad de BAP de acuerdo a los tratamientos. Se sembró una semilla por tubo de ensayo de $150 \times 22 \text{ mm}$, en campana de flujo laminar previamente desinfectada y se establecieron para su germinación 120 semillas. Las semillas se expusieron a 0, 2.5 y 5 mg L^{-1} BAP durante 80 días, las plantas con mayor número de brotes mostraron hiperhidratación, por lo que las plantas madre se subcultivaron con las mismas características descritas del medio, únicamente se cambiaron las concentraciones de 2.5 a 0.5 y de 5 a 1 mg L^{-1} respectivamente. Los brotes generados a los 30 días del segundo subcultivo fue el material inicial para los experimentos.

Etapa de multiplicación (SC3)

Para la obtención del material vegetal para los siguientes subcultivos, se extrajeron los brotes de los tubos y se procedió a separarlos en cajas Petri. Los brotes individualizados se establecieron en medio de cultivo fresco suplementado con diferentes concentraciones de BAP, de acuerdo con los tratamientos asignados en el subcultivo (SC3); es decir, los brotes generados en el SC2 que estuvieron durante 30 días de cultivo con 0.5 mg L^{-1} de BAP, después de la separación del brote madre (Figura 1B) se establecieron en diferentes concentraciones de BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2.0 y 2.5 mg L^{-1}) con 21 repeticiones.



Figura 1. A) separación de brotes, para establecer SC3; B) repetición 10 de izquierda a derecha (1,0.5, 2, 2.5 y 1.5 mg L⁻¹ BAP), SC3; C) repetición 18 de tratamientos de izquierda a derecha (0, 2.5, 0.5, 1.5, 2, 1 mg L⁻¹BAP) SC4; D) brotes con HHI, generados en SC3; and E) tratamientos SC4-1 R6 tratamientos de izquierda a derecha (1, 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP) SC4-1.



Subcultivo (SC4)

Se utilizaron los brotes sanos generados en las concentraciones 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ BAP, del SC3, se establecieron en 0.5 mg L⁻¹ BAP y un testigo sin reguladores, se ocuparon 22 repeticiones por tratamiento.

Subcultivo (SC4-1)

Los brotes con hiperhidratación inicial (Figura 1D) se establecieron al azar en 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹ BAP con 22 repeticiones. Las variables registradas para los experimentos fueron, en enraizamiento número de raíces (NR), longitud de raíz (LR) en cm, porcentaje de supervivencia de brotes con raíz (PSBR) y en los subcultivos de multiplicación: número de brotes (NB), longitud de hoja (LH) en cm, ancho base tallo (ABT) en cm, porcentaje de brotes con raíz (PBR) y porcentaje de brotes propágulo hiperhidratados (PBHH).

Enraizamiento *ex vitro*

Se ocuparon los brotes generados en el segundo subcultivo (SC2) una vez transcurridos 30 días, se separaron de los brotes que generaron y éstos se regresaron a su tubo de ensaye y después de 58 días se establecieron 60 brotes en un experimento completamente al azar, con 15 repeticiones a 0, 1 000, 2 000 y 4 000 mg kg⁻¹ de Radix 10 000[®], en tubetes. La preparación de la mezcla se realizó con Radix[®] 10 000 y talco sin aroma. Se emplearon tubetes de 140 ml de volumen soportados por sus bases, se lavaron ambos con una solución de detergente biodegradable Roma[®] y se enjuagaron con agua corriente del grifo y se desinfectaron con una solución de NaOCl al 30 % v/v durante 20 min.

La mezcla de sustrato que se empleó fue a base de Peat moss Promix[®] y perlita (1:1 v/v), la esterilización se realizó en una autoclave, a una presión de 1.7 kg cm⁻², 30 min (dos veces). Se extrajeron los brotes y se asperjó la base del tallo con una solución de Timsem[®] 1 g L⁻¹. Se eliminó el agar de la base del tallo con agua desionizada y esterilizada, se eliminó el exceso de agua de la base del tallo, posteriormente se impregnó con la mezcla de Radix[®] según el tratamiento asignado, después de trasplantado se regó con 20 ml de agua desionizada esterilizada a cada brote. A cada tubete se le colocó una bolsa 8 x 26, para crear un microclima, sujetándola con una liga para iniciar el proceso de enraizamiento. Se trasladaron los tubetes

al cuarto de incubación donde se les colocó en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, con lámparas de luz blanca- fría, con una intensidad de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al día 40, se eliminó la bolsa de los tubetes y se mantuvieron en cuarto de incubación hasta los 80 días, tiempo en el que se realizó la evaluación.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar en los cuatro experimentos, el análisis de datos se realizó mediante la técnica Anova de un factor, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Tukey, honestly significant difference (HSD), por sus siglas en inglés). En el caso de las variables de subcultivo PBR, PHH y en enraizamiento PSBR se analizó mediante regresión lógica por ser variables binomiales y la comparación de medias fue mediante emmeans Tukey, todos los análisis se realizaron en el programa estadístico RStudio.

Resultados y discusión

Multiplicación en el subcultivo de brotes (SC3)

Número de brotes (NB)

La formación de brotes adventicios en la base del tallo fue significativa ($p \leq 0.05$), entre los tratamientos, los valores más altos (6.35 y 5.71 brotes por propágulo) se registraron con 1.5 y 2.5 mg L^{-1} BAP, respectivamente (Cuadro 1 y Figura 1B). Los resultados de esta investigación son superiores a los de (Osorio-Rosales, 2005) cuando usaron plántulas sin raíz y hojas recortadas como explante, generaron 5.4 brotes por plántula en *B. gracilis* a una concentración de 5 mg L^{-1} de BAP y con 1 mg L^{-1} de BAP generó 1.9 brotes por explante en *B. recurvata*, pero son menores cuando ellos usaron el explante de secciones longitudinales en *B. gracilis* y *B. recurvata* con 5 mg L^{-1} BAP indujeron 8.2 y 11.1 brotes por explante.

Cuadro 1. Respuesta de brotes de *B. hookeri* originados en 0.5 mg L^{-1} de BAP, expuestos a concentraciones de BAP del SC3 a 30 de iniciado.

Tratamientos AP (mg L^{-1})	LH (cm)	NB	NR	LR (cm)	PBR	PHH
0	7.78 a	0.14 b	0.38 a	1.34 a	33 a	10 a
0.5	3.29 b	4.33 a	0 b	0 b	0 a	19 a
1	2.3 b	5.52 a	0 b	0 b	0 a	29 a
1.5	2.09 b	6.35 a	0 b	0 b	0 a	45 a
2	2.56 b	5.66 a	0 b	0 b	0 a	52 a
2.5	1.94 b	5.71 a	0 b	0 b	0 a	67 b
*	2.2×10^{-16}	9.7×10^{-08}	4.9×10^{-07}	2.1×10^{-07}	5.2×10^{-05}	0.0004

LH= longitud de hoja más larga en cm; NB= número de brotes; NR= número de raíces adventicias principales; LR= Longitud de raíz adventicia más larga; PBR= porcentaje de brotes con raíz; PHH= porcentaje de hiperhidratación de brotes propágulo; *= valor-*p*. Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

También coinciden con lo reportado por Reyes-Silva *et al.* (2013) al usar como explantes basales de 10 a 15 mm, sin hojas ni raíces en medio MS suplementado con BAP en concentraciones 3 a 4 mg L^{-1} en 10 especies de los géneros *Beaucarnea*, *Dasyllirion* y *Nolina* generaron 3.9 a 10.3 brotes por explante. Asimismo, coinciden con Vadillo-Pro *et al.* (2016) con explantes de secciones longitudinales de *B. purpussi* y una concentración de 3 mg L^{-1} BA indujeron 6.74 brotes por explante.

Longitud de hoja (LH) en cm

Las longitudes de hoja más largas (7.78 y 3.29 cm) se obtuvieron en 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP (Cuadro 1) las que fueron significativas ($p \leq 0.05$). Los resultados coinciden con Osorio-Rosales (2005) quienes reportaron que el desarrollo del primer brote inhibió o limitó el desarrollo de brotes subsecuentes, esto explica la heterogeneidad observada para la altura de brotes desde 0.3 a 10 cm en *B. recurvata* y *B. gracilis*.

Número de raíces (NR), longitud de raíces (LR) en cm y porcentaje de brotes con raíz (PBR)

El NR, LR y PBR fueron significativas ($p \leq 0.05$). El NR (0.38 raíces) sólo estuvieron presentes en brotes del tratamiento testigo (0 mg L⁻¹ BAP), en los demás tratamientos no se formaron raíces. El largo de raíz fue de 1.34 cm en el testigo (Cuadro 1). Los resultados anteriores coinciden con Gil *et al.* (2019) quienes encontraron que sin la aplicación de reguladores se obtuvo mayores porcentajes de raíz en *Cattleya trianae*.

Los resultados obtenidos por Núñez *et al.* (2021) en *C. hookeri* fueron mayores (100%) de enraizamiento en medio MS sin reguladores. Con respecto al porcentaje de brotes con raíz, se obtuvo 33 % en el testigo y los demás tratamientos con BAP no formaron raíces (Cuadro 1). Estos resultados difieren con Guillén *et al.* (2015) quienes registraron un porcentaje superior de enraizamiento (92.6%) *in vitro* que obtuvieron en *B. inermis* con un medio MS sin fitohormonas. También los resultados que lograron en el género *Beaucarnea* en medio MS con 2 g L⁻¹ de carbón activado fueron mayores, 63 y 75% de enraizamiento (Reyes-Silva *et al.*, 2013). El resultado que se obtuvo es menor porcentaje de enraizamiento en el testigo comparado con *B. gracilis* y *B. recurvata*, donde se observó el enraizamiento de más de 60 y 80% de los brotes cultivados en medio MS sin la aplicación de fitohormonas.

Porcentaje de hiperhidratación de brotes propágulo

El tratamiento con mayor hiperhidratación fue el tratamiento 2.5 mg L⁻¹ BAP con 67% de hiperhidratación (Cuadro 1). Resultados similares reportaron Vargas-Castillo (2010) quienes encontraron 28.66 a 41% de hiperhidratación en *Geophila macropoda* en concentraciones de 3 y 4 mg L⁻¹. Vadillo-Pro *et al.* (2016) registraron que la exposición de explantes de 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ de TDZ mostraron 4.38 y 7.31 brotes hiperhidratados por explante respectivamente, así como 5 mg L⁻¹ de BA mostraron 3.62 brotes hiperhidratados por explante.

Subcultivo brotes sanos (SC4)

Número de brotes (NB)

La formación de brotes adventicios en la base del tallo fue significativo ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, el mayor NB se generó con la concentración 0.5 mg L⁻¹ BAP, OB (9.7 brotes por propágulo), las otras dos mejores concentraciones que produjeron mayor número de brotes (7.37 y 7.21 brotes por propágulo) fueron 1 y 1.5 mg L⁻¹ BAP de origen de brote (Cuadro 2). Son inferiores los números de brotes reportados por Waly *et al.* (2018) en *B. recurvata* en concentración óptima 0.4 mg L⁻¹ BAP en medio B5 para la etapa de multiplicación. Así también Gil *et al.* (2019) en *Cattleya trianae* en donde bajas dosis de BAP (0.05 mg L⁻¹) generaron el mayor porcentaje de brotes, el tratamiento con BAP 0.5 y 2 mg L⁻¹ aumentaron la respuesta de brotes y disminuyeron la formación de raíces.



Cuadro 2. Respuesta de brotes sanos de *C. hookeri* con origen SC3, subcultivados 30 días a concentraciones 0 y 0.5 mg L⁻¹ BAP, SC4.

Tratamientos		LH (cm)	NB	NR30	LR30 (cm)	PBR	PHH
BAP (mg L ⁻¹)	OB						
0	0.5	10.22 a	0.04 c	1.04 a	3.25 a	68 a	0 a
0.5	0.5	4.33 b	9.7 a	0 b	0 b	0 a	14 a
0.5	1	3.54 bc	7.37 ab	0 b	0 b	0 a	18 a
0.5	1.5	3.03 bc	7.21 ab	0 b	0 b	0 a	5 a
0.5	2	2.6 c	5.81 b	0 b	0 b	0 a	23 a
0.5	2.5	2.4 c	6.09 b	0 b	0 b	0 a	5 a
	*	2.2x10 ⁻¹⁶	5.06x10 ⁻¹²	2.2x10 ⁻¹⁶	2.2x10 ⁻¹⁶	7.1x10 ⁻¹³	0.051

OB= origen de brote SC3 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg L⁻¹; LH= longitud de hoja más grande; NB= número de brotes; NR= número de raíces adventicias principales; LR= longitud de raíz adventicia más larga; PBR= porcentaje de brotes con raíz; PHH= porcentaje de brotes propagulo hiperhidratados; *= valor-*p*. Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Longitud de hoja (LH) en cm

La variable LH fue significativa ($p \leq 0.05$), donde el mejor tratamiento para la LH más larga (10.22 cm) fue el testigo y el segundo mejor tratamiento fue 0.5 mg L⁻¹ (4.33 cm) (Cuadro 3). Adelberg y Naylor (2012) reportaron que, al usar medio líquido, las plantas fueron más grandes y disminuyó el efecto negativo del enraizamiento, sin afectar la tasa de multiplicación, así la concentración 6 μM (1.35 mg L⁻¹) BA en medio líquido fue óptima para la multiplicación y enraizamiento de *Aloe barbadensis*.

Cuadro 3. Respuesta en la recuperación de brotes con HHI, origen del SC3, 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ de BAP y generación de brotes al día 30, SC4-1.

Tratamiento	LH (cm)	ABT (cm)	NB	NR	LR (cm)	PBR	HH5	HH30
BAP (mg L⁻¹)								
0	6.78 a	0.31 b	0.09 b	0.71 a	1.44 a	43 a	95.2 a	23.8 a
0.5	3.76 b	0.66 a	5.63 a	0 b	0 b	0 a	86.4 a	18.2 a
1	1.89 b	0.74 a	5.4 a	0 b	0 b	0 a	90.9 a	22.7 a
*	6.4x10 ⁻⁶	1.3x10 ⁻⁶	5.9x10 ⁻¹⁰	3E ⁻⁰⁴	1E ⁻⁰⁴	7.5x10 ⁻⁰⁶	0.59	0.89

LB= longitud de brote en cm; ABT= ancho base de tallo en cm; NB= número de brotes; NR= número de raíces adventicias; LR= longitud de raíz; *= valor-*p*. Medias con distinta letra en la misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Número (NR), longitud de raíces (LR) en cm y porcentaje de brotes con raíz (PBR)

Con respecto a NR y LR fueron significativas a $p \leq 0.05$, sin embargo, el PBR no fue significativo al mismo nivel de significancia. El NR (1.04 raíces) únicamente estuvieron presentes en brotes del tratamiento testigo (0 mg L⁻¹ BAP), ya que en los demás tratamientos no se formaron raíces. En el testigo, el largo de raíz fue de 3.25 cm (Cuadro 1). El tratamiento sin fitohormonas en medio MS permitió la formación de raíces en *B. inermis*, aunque en menor proporción comparado con 1 mg L⁻¹ AIB (Guillen *et al.*, 2015).

El porcentaje de brotes con raíz fue de 68%, en el testigo y los demás tratamientos con BAP no formaron raíces (Cuadro 1). Por su parte Vadillo-Pro *et al.* (2016) reportaron que en brotes

subcultivados individualmente en *B. purpurea* en medio MS y ½ MS ambos suplementados con 1g L⁻¹ de carbón activado indujeron un 85 a 95% de brotes.

Porcentaje de hiperhidratación de brotes propágulo (PHH)

El porcentaje de hiperhidratación varió de 5 a 23% (Cuadro 2); sin embargo, esta variable no fue significativa ($p \leq 0.05$). Los resultados obtenidos coinciden con Vargas-Castillo (2010) quienes encontraron hiperhidratación en porcentajes menores de 20% en los medios que fueron suplementados de 0 a 2 mg L⁻¹ de BAP en *G. macropoda*.

Subcultivo de brotes con HHI (SC4-1)

Las variables LH, ABT, NB, NR y LR fueron significativas a excepción de PBR y PHH a $p \leq 0.05$. A la concentración de 0.5 y 1 mg L⁻¹ del origen de brote no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 3). Los resultados obtenidos por Ramírez-Gottfried *et al.* (2021) fueron superiores al comparar el medio MS con vermicomposta en la etapa de multiplicación de *Dasyllirion cedrosanum*. La adición de 1 mg L⁻¹ BAP más 0.2 mg L⁻¹ AIA en medio MS generaron mayor promedio de brotes (8.25 brotes/explante). En *Aloe barbadensis*, la concentración 6 µM (1.35 mg L⁻¹) de BA en medio líquido fue óptima para la multiplicación y enraizamiento.

Longitud de hoja (LH) en cm

Las longitudes de hoja más largas (6.78 cm) se obtuvieron en el testigo (0 mg L⁻¹ BAP) (Cuadro 3). La importancia de longitudes de hoja de mayor tamaño lo comprobó Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) quienes determinaron en *Agave inaequalis* que el tamaño de planta y el medio de cultivo afectó el enraizamiento de las plantas. Las plantas de longitud de 4 cm con más de dos raíces presentaron una sobrevivencia de 100%.

Número (NR), longitud de raíces (LR) en cm y porcentaje de brotes con raíz (PBR)

El NR, LR y PBR fueron significativas ($p \leq 0.05$). El NR (0.71 raíces) sólo estuvieron presentes en brotes del tratamiento testigo (0 mg L⁻¹ BAP), ya que en los demás tratamientos no se formaron raíces. El largo de raíz fue de 1.44 cm en el testigo. Los resultados coinciden con Zhang *et al.* (2013), quienes en medio MS libre de reguladores obtuvieron brotes regenerados mediante organogénesis de *Agave hybrid*.

El porcentaje de brotes con raíz fue de 43%, en el testigo y los demás tratamientos con BAP no formaron raíces (Cuadro 3). Al respecto Reyes-Silva *et al.* (2013), reportaron que al evaluar enraizamiento a los 45-50 días en brotes generados en multiplicación con un medio base al 50% en especies *Beaucarnea goldmanni*, *B. recurvata* y *B. gracilis* se obtuvieron los porcentajes más bajos de enraizamiento (34, 23 y 14% respectivamente), no así en los géneros *Dasyllirion* y *Nolina* que alcanzaron de 75 a 100% de enraizamiento. Asimismo Vargas-Castillo (2010) determinaron hiperhidratación en porcentajes menores de 20% en los medios que fueron suplementados con 0 a 2 mg L⁻¹ de BAP en *G. macropoda*.

Porcentaje de brotes hiperhidratados

Los brotes al día cinco después de establecidos en medio de subcultivo no mostraron diferencias significativas, los porcentajes de hiperhidratación variaron de 86.4 a 95.2% (Cuadro 4). La hiperhidratación inicial fue en hojas más jóvenes con coloración verde claro a amarillo claro en brotes sembrados a 1 mg L⁻¹ de BAP. En el caso de 1.5, 2 y 2.5, además de los síntomas anteriores, mostraron bases más anchas del brote madre, así como ligera deformación de hoja y menor cantidad. A los 30 días de subcultivo se evaluó hiperhidratación, las concentraciones en los tres tratamientos ayudaron en la recuperación de la hiperhidratación inicial, no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 3 y Figura 1E). Los resultados anteriores coinciden con (Millán-Soto *et al.*, 2019) quienes reportaron la reducción de hiperhidratación

en 10.4% en *Asparagus officinalis* al realizar resiembras de rizomas en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Enraizamiento *ex vitro*

Porcentaje de supervivencia de brotes enraizados (PSBR)

En todos los tratamientos se observó la formación de raíces; sin embargo, el mayor porcentaje de supervivencia de brotes con raíz (73.33%) se obtuvo en el testigo (Cuadro 4 y Figura 2). La mayor supervivencia de brotes enraizados (brotes propágulo sometidos a enraizamiento después de separarlos de sus brotes) se puede explicar en la capacidad de algunas especies de regenerar raíces. Este comportamiento es similar a lo que obtuvo Guillen *et al.* (2015) en brotes de *B. inermis*.

Cuadro 4. Enraizamiento *ex vitro* y aclimatación de brotes después de su primera producción de brotes en *B. hookeri* a 80 días del trasplante.

Tratamientos	NR	LR	PSBR
0	2.41 a	11.43 a	73.3 a
1 000	2.12 a	9.87 a	33.3 a
2 000	1.76 a	5.73 a	46.7 a
4 000	1.2 a	4.89 a	40 a
*	0.41	0.1	0.1272

NR= número de raíces primarias; LR= longitud de raíz primaria; PSBR= porcentaje de supervivencia de brotes con raíz; *= $p \leq 0.05$. Medias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Figura 2. Tratamientos de enraizamiento *ex vitro*, a 80 días de su establecimiento. A) 1 000 mg kg⁻¹; B) 2 000 mg kg⁻¹; C) 4 000 mg kg⁻¹; y D) 0 mg kg⁻¹.



En *Cattleya trianae* el tratamiento sin BAP formó raíces en 7.35% (Gil *et al.*, 2019). Por otra parte, Puente-Garza *et al.* (2015) establecieron los brotes obtenidos en multiplicación en medio MS sin reguladores y a los 30 días generaron raíces en *Agave salmiana*, lo que permitió una aclimatación exitosa de los mismos. Zhang *et al.* (2013), emplearon medio MS libre de reguladores en brotes de *Agave hybrid*, regenerados mediante organogénesis, estos generaron un número promedio de 5.39 raíces por brote con una longitud de 8.44 cm por raíz dentro de 30 días.

En el bajo enraizamiento de brotes que fueron inmersos en mezcla con Radix® posiblemente pudo afectar la cantidad de talco que quedó impregnada en la base de tallo, siendo un obstáculo

físico entre el brote y sustrato. En los subcultivos de esta investigación los brotes en los tratamientos testigo que no tuvieron reguladores generaron un 33% en SC3, 68% en SC4 y 43% en SC4-1 en un lapso de 30 días de subcultivo, estos sólo estuvieron expuestos a BAP durante 30 días cuando fueron generados del brote propágulo, mientras que los brotes en enraizamiento *ex vitro* estuvieron el doble de tiempo.

Los resultados son similares a los de Adelberg y Naylor (2012), quienes reportaron que la exposición de los brotes a citocininas como BAP, inhibieron el enraizamiento. Lo anterior puede deberse a que un remanente de citocininas inhibiera el enraizamiento y las plantas en agar fueron más afectadas que las de medio líquido. Este remanente redujo el enraizamiento de 92% (control) a 68% con 10 μM (2.25 mg L^{-1}) BAP en plantas de *Aloe barbadensis*.

Conclusiones

La dosis 0.5 mg L^{-1} de BAP permite la mayor producción de brotes en 30 días con una mayor longitud de hoja. Además, esta concentración coadyuva al enraizamiento *ex vitro*, así como disminuye la probabilidad de aparición de brotes hiperhidratados. El tratamiento Testigo (BAP 0 mg L^{-1}), puede utilizarse para enraizar brotes sanos y de buen tamaño en 30 días, ya que a la par de crecer, forman raíces y en 60 días se tiene una planta completa y aclimatizada.

Agradecimientos

La autora María del Rosario Chávez-Muñoz agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca a la estudiante de maestría en Ciencias Agrícolas.

Bibliografía

- 1 Adelberg, J. and Naylor, A. J. 2012. Effect of cytokinin on multiplication and rooting of *Aloe barbadensis* during micropropagation on agar and liquid medium. USA. J. Medicinally Active Plants. 1(1):1-5. Doi: <https://doi.org/10.7275/R5251G4V>.
- 2 Aureoles-Rodríguez, F.; Rodríguez-de la O, J. L.; Legaria-Solano, J. P.; Sahagún-Castellanos, J. y Peña-Ortega, M. G. 2008. Propagación *in vitro* del 'maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch.) una especie amenazada de interés económico. México. Revista Chapingo Serie Horticultura. México. 14(3):263-269. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S1027-152X2008000300006>.
- 3 De-Nova, J. A.; Castillo-Lara, P.; Gudiño-Cano, A. K. y García-Pérez, J. 2018. Flora endémica del estado de San Luis Potosí y regiones adyacente en México. México. Árido-Ciencia. 3(1):21-41. <https://www.researchgate.net/publication/326260668-Flora-endemica-del-estado-de-San-Luis-Potosi-y-Regiones-Adyacentes-en-Mexico>.
- 4 DOF. 2019. Diario Oficial de la Federación. Modificación del anexo normativo III, lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-Especies nativas de México de la flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, publicada.
- 5 Gil, C. A. I.; Ariza, C. C. A; Castillo, T. L. M.; Salgado, D. L. E.; Banda, S. L. y Vanegas, M. L. E. 2019. Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. Colombia. Rev. UDCA. & Div. Cient. 22(2):1-9. <http://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275>.
- 6 Guillen, S.; Martínez, P. A.; Martínez, H. y Martínez, A. J. G. 2015. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae) una especie amenazada del noreste de México. México. Botanical Science. 93(2):221-230. <https://botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/129/pdf-126>.

- 7 Hernández-Sandoval, L. 2019. Catálogo nomenclatural de la familia Nolinaceae Nakai en México. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Bases de datos SNIB-CONABIO proyecto KT011. México, Ciudad de México. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/KT011-Apendice-Listado-Taxonomico.pdf>.
- 8 Hernández-Sandoval, L. 2020. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 213. Familia Nolinaceae. 213:1-42. <https://www.researchgate.net/publication/340247199-nolinaceae-flora-del-bajio-y-de-regiones-adyacentes>.
- 9 Martínez, M.; Hernández, S. L. and Carrillo, L. 2014. Foliar anatomy of *Beaucarnea* Lemaire (Nolinaceae ss). *Plant Syst Evol.* 300(1):2249-2258. Doi: 10.1007/s00606-014-1048-2.
- 10 Millán-Soto, G.; Robert, M. L.; Tiznado-Hernández, M. E.; Gutiérrez, A. y Esqueda, M. 2019. Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. México. *Agrociencia.* 53(4):549-561. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1827>.
- 11 Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. USA. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 12 Núñez, C. C.; González, R. H. y Fernández, P. Y. L. 2021. Micropropagación de *Calibanus hookeri* (lem.) trel. (1911). Una especie amenazada. Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 23(1):46-54. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.80873>.
- 13 Puente-Garza, C. A.; Gutiérrez-Mora, A. and García-Lara, S. 2015. Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. Australia. *Frontier in Plant Science.* 6(1026):1-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655248/>.
- 14 Osorio-Rosales, M. L. and Mata-Rosas, M. 2005. Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. USA. *Hortscience.* 40(5):1481-1484. <https://www.researchgate.net/publication/268431289-Micropropagation-of-Endemic-and-Endangered-Mexican-Species-of-Ponytail-Palms>.
- 15 Ramírez-Gottfried, R. I.; Puente-Valenzuela, C. O.; Chávez-Simental, J. A.; Espinosa-Palomeque, B.; García-Carrillo, M.; Guillén-Enríquez, R. R. y González-Cervantes, G. 2021. Extracto de vermicompost como medio basal en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* *Dasyllirion cedrosanum*. *Terra Latinoamericana.* 39:1-11. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S018757792021000100149>.
- 16 Rojas-Piña, V.; Olson, M. E.; Alvarado-Cárdenas, L. O. and Eguiarte, L. E. 2014. Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (Ruscaceae) as distinct from *Nolina* and submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*. USA. *Taxon.* 63(6):1193-1211. <https://www.researchgate.net/publication/269998108-Molecular-phylogenetics-and-morphology-of-Beaucarnea-Ruscaceae-as-distinct-from-Nolina-and-the-submersion-of-Calibanus-into-Beaucarnea/link/56c7841508ae5488f0d2d866/download>.
- 17 Reyes-Silva, A. I.; Morales-Muñoz, C. F.; Pérez-Reyes, M. E. y Pérez-Molphe, E. 2013. Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas. México. *Investigación y ciencia de la Universidad de Aguascalientes.* 21(58):2-20. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67428815002.pdf>.
- 18 SEMARNAT. 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.
- 19 Vargas-Castillo, M. P. y Abdelnour-Esquivel, A. 2010. Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. Dc) a partir de embriones cigóticos. Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana.* 21(1):73-83. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v21n1/a08v21n1.pdf>.

- 20 Vadillo-Pro, Ma. C.; Hernández-Sandoval, L. and Malda-Barrera, G. 2016. *in vitro* regeneration from longitudinal sections of seedling of *Beaucarnea purpusi* Rose, an endemic and endangered species. USA. HortScience. 51(3):279-284. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/51/3/article-p279.xml>.
- 21 Waly, K. A.; Abdel, F. M. and Shoman, A. A. 2018. Effect of media type and BAP concentrations of micropropagation during multiplication stage on ponytail palm (*Beaucarnea recurvata* Lem.). Egypt. Hortscience Journal of Suez Canal University. 7(1):41-45. Doi:16.21608/hjsc.2018.58333.
- 22 Zhang, Y. M.; Li, X.; Chen, Z.; Li, J. F.; Lu, J. Y. and Zhou, W. Z. 2013. Shoot organogénesis and plant regeneration in agave hybrid, No.11648. *Scientia Horticulturae*. China. 161:30-34. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423813003464>.



Micropropagación y enraizamiento *ex vitro* de *Beaucarnea hookeri* (LEM.) Baker

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 May 2023
Date accepted: 01 July 2023
Publication date: 30 October 2023
Publication date: October 2023
Volume: 14
Issue: 7
Electronic Location Identifier: e3223
DOI: 10.29312/remexca.v14i7.3223

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

Calibanus hookeri
cultivo *in vitro*
Nolinaceae
organogénesis
peligro de extinción

Counts

Figures: 2
Tables: 4
Equations: 0
References: 22
Pages: 0