
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



Propagación *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata*
Lemaire (Nolinaceae)) por medio de la proliferación de yemas
axilares

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ JUVENCIO CASTAÑEDA NAVA

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ABRIL DE 2009



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1402/ C. C. BIOLOGÍA

C. JOSE JUVENCIO CASTAÑEDA NAVA

PRESENTE

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción: **Tesis** con el título : **“Propagación in vitro de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (Nolinaceae))”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba** y como asesor al **M.C. Antonio Mora Santacruz**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 21 de noviembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **Tesis** con el título: **“Propagación *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (Nolinaceae)) por medio de la proliferación de yemas axilares”** que realizó el pasante **JOSÉ JUVENCIO CASTAÑEDA NAVA** con número de código **399283645** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.


Atentamente
Las Agujas, Zapopan, Jal., 23 de Marzo de 2009







DIRECTOR
DR FERNANDO SANTACRUZ
RUVALCABA



ASESOR
MC. ANTONIO MORA SANTACRUZ



Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dr. Liberato Portillo Martínez		29 marzo 2009
Dr. Ramón Rodríguez Macías		23 marzo 2009
Dr. Carlos Ramírez Serrano		26-03-09
Supl. Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán		24/03/2009

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de vivir.

A mi mamá por formarme mi corazón, manos y pies.

A mi papá por enseñarme que mis manos son para trabajar, mi corazón para amar y mis pies para caminar tan lejos como quisiera llegar.

A mis hermanos (Ana, Viki, Israel, Juan y Lupita) por caminar juntos en este sendero de la vida.

A mi esposa por regalarme su corazón y ser el mástil de mi vida.

Al Dr. Fernando por su apoyo en este trabajo y su gran paciencia.

A mis sinodales por ayudar a mejorar mi trabajo.

A mi tío Ascencio por ser un ejemplo a seguir

A todos mis maestros por formarme como un profesionalista.

ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE CUADROS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2. 1. Descripción del género <i>Beaucarnea</i>	3
2. 2. Usos del género <i>Beaucarnea</i>	3
2. 3. Distribución de <i>Beaucarnea</i>	4
2. 4. La propagación de los vegetales	5
2. 5. Las fitohormonas	6
2. 6. El cultivo <i>in vitro</i>	9
2. 6. 1. Proliferación de yemas axilares	9
2. 6. 2. Organogénesis	10
2. 6. 3. Embriogénesis somática	10
2. 6. 4. Adaptación <i>ex vitro</i>	11
2. 7. Ventajas y desventajas de técnicas de cultivo vía <i>in vitro</i> líquido y sólido	11
2. 8. Propagación de <i>Beaucarnea</i>	12

2. 8. 1. Propagación tradicional	12
2. 8. 2. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Beaucarnea</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
5. 1. Objetivo general	16
5. 2. Objetivos particulares	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6. 1. Proliferación de yemas axilares	17
6. 2. Producción de brotes por yemas axilares en diferentes contenedores	18
6. 3. Estimulación de raíz	19
6. 4. Incubación del material vegetativo	19
6. 5. Aclimatación en el invernadero	19
6. 6. Análisis estadístico	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7. 1. Proliferación de yemas axilares	21
7.2. Producción de brotes por yemas axilares en diferentes contenedores	24
7. 3. Estimulación de raíz <i>in vitro</i>	29
7. 4. Aclimatación en el invernadero	32

7. 4. 1. Evaluación del factor raíz	32
7. 4. 2. Evaluación del factor sustrato	33
7. 4. 3. Evaluación del factor fertilización	35
8. CONCLUSIONES	38
9. LITERATURA CITADA	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución del género <i>Beaucarnea</i> en México	5
Figura 2. Comportamiento de los tratamientos en la proliferación de yemas axilares	23
Figura 3. Efecto de los tratamientos entre los 30 y 140 d	27
Figura 4. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Beaucarnea recurvata</i> en diferentes contenedores.	28
Figura 5. Estimulación para producción de raíz.	31
Figura 6 <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire establecidas a condiciones <i>ex vitro</i>	37

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Proliferación de yemas axilares de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 65 d del establecimiento <i>in vitro</i> .	22
Cuadro 2	Proliferación de yemas axilares de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire en diferentes contenedores a los 30 d.	24
Cuadro 3	Proliferación de yemas axilares de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire en diferentes contenedores a los 50 d.	25
Cuadro 4	Proliferación de yemas axilares de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire en diferentes contenedores a los 70 d.	25
Cuadro 5	Proliferación de yemas axilares de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire en diferentes contenedores a los 140 d.	26
Cuadro 6	Enraizamiento de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 30 d del establecimiento <i>in vitro</i> .	29
Cuadro 7	Enraizamiento de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 50 d del establecimiento <i>in vitro</i> .	30
Cuadro 8	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Número de hojas para el factor raíz.	32
Cuadro 9	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Grosor del tallo para el factor raíz.	33
Cuadro 10	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Número de la hoja para el factor sustrato.	33
Cuadro 11	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Longitud de la hoja para el factor sustrato.	34
Cuadro 12	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Grosor del tallo para el factor sustrato.	35
Cuadro 13	Aclimatación de <i>Beaucarnea recurvata</i> Lemaire a los 120 d. Longitud de la hoja para el factor fertilizante.	35

RESUMEN

Beaucarnea recurvata Lemaire es una especie endémica de México, apreciada por su belleza ornamental, y que se encuentra amenazada (NOM-059-ECOL-2001). Es por ello que se necesita buscar alternativas sustentables de propagación para cubrir la demanda comercial, una de ellas puede ser el cultivo *in vitro*. En este trabajo, se desarrolló una metodología para su propagación *in vitro* por medio de la proliferación de yemas axilares, en el que se evaluaron los reguladores de crecimiento: ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y benciladenina (BA) con tres diferentes dosis cada uno. El tratamiento que produjo proliferación de yemas axilares en mayor número fue con 5 mg/L de BA. Para la proliferación de yemas axilares también se evaluaron los contenedores Rita® y Orbitabion®, frascos de alimento infantil y contenedores de plástico. Se tuvo como resultado que en los contenedores de plástico con medio sólido se produjo mayor número de brotes. Posteriormente se evaluaron los siguientes factores para la estimulación de producción de raíz: los solidificantes del medio del cultivo (agar y Phytigel®), carbón activado, hemisulfato de adenina y la auxina ácido indolbutírico (AIB); donde los explantes que contenían AIB produjeron el promedio de raíces más alto. Las plantas ya enraizadas se aclimataron en invernadero, en condiciones de humedad controlada se colocaron en diferentes sustratos, las cuales se fertilizaron con tres dosis de lixiviado de vermicomposta de lombriz 0, 5 y 10 mL. Se obtuvo como resultado que las plantas con raíz y en un sustrato de combinación de 30 % turba, 30 % estiércol de borrego y 40 % agrolita tuvieron mejor desarrollo.

1. INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso cuenta con una gran riqueza en recursos genéticos en flora y fauna. Debido a que cuentan con humedales, selvas, bosques, zonas semidesérticas y desiertos, en todos estos ecosistemas presenta especies endémicas. Al ser un país con muchos recursos naturales, los coleccionistas de México y del mundo han sobreexplotado mamíferos, aves, reptiles, invertebrados, y plantas como orquídeas, cactus, agaváceas, maderas preciosas, etc; y no son la excepción las nolináceas, en México tienen una amplia distribución de norte a sur (García-Mendoza y Galván, 1995). El género *Beaucarnea* se distribuye principalmente en el Golfo de México y Centroamérica en zonas semiáridas y de selva baja caducifolia, crecen en suelos rocosos con pocos nutrientes, en acantilados y montañas con pronunciadas pendientes (Contreras y col., 2008). La selva baja caducifolia o bosque tropical caducifolio, abarca 32.5 millones de hectáreas en 578 municipios y 21 estados de México. La distribución de estas zonas cubre porciones importantes del área costera del Pacífico, la Península de Yucatán, centro de Veracruz, sur de Tamaulipas y occidente y sur de México. Este hábitat ha sido modificado por el uso para la agricultura (24%), la ganadería (20%) y otros usos (9%), de modo que sólo subsiste 45% de la cubierta de vegetal (Contreras y col., 2008). *Beaucarnea* se encuentra amenazada debido a que tiene un alto potencial ornamental y la demanda para la fabricación de cestos a partir de hojas tejidas, por lo que son saqueadas de su hábitat de manera ilegal (Soler y Soler, 2004). Existen estudios en los que señalan que las poblaciones de *B. gracilis* Lemaire; alcanzan una densidad de 16.7 individuos/ha a causa del sobre pastoreo y la baja sobrevivencia de organismos jóvenes (Cardel y col., 1997). El estado crítico en el que se encuentran, es por la continua fragmentación y destrucción de su hábitat, ocasionado por la expansión de la frontera agrícola y ganadera, extracción de leña, madera y crecimiento urbano. *B. recurvata* Lemaire es una especie endémica de México que sólo se distribuye en los estados de Oaxaca y Veracruz (Contreras y col., 2008). Estas plantas tardan años en llegar a

producir semilla y cuando la producen, éstas son colectadas para venderlas en viveros, evitando la regeneración natural (Gilman y Watson, 1993). *Beaucarnea* tiene capacidad de adaptarse tanto en el interior como el exterior, presenta textura y dimensión de su tallo que la hace muy apreciada y por eso es saqueada de su hábitat, se lucra con plantas y semillas. Muchos de los productores las cultivan por medio de semillas que obtienen de poblaciones que se encuentran en hábitat natural, por lo cual dañan su recuperación, consecuentemente se encuentra en estatus de especie amenazada en la Norma Mexicana NOM-059-ECOL-2001, a pesar de que es una especie en esta categoría y ser delito extraerla de su hábitat, no ha bastado para frenar este grave problema. La fuerte demanda por esta especie en los últimos años, ha incrementado la venta ilegal, haciendo que este comercio salga del control de las instituciones encargadas de su protección. Aunque, existen normas que permiten hacer el aprovechamiento legal de la especie no se ha frenado la explotación ilegal.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Descripción del género *Beaucarnea*

Es una planta endémica de México y Centroamérica, se caracteriza por tener un tallo engrosado en la base que puede alcanzar en estado natural un diámetro superior a 3 m y una altura mayor de 9 m, su tallo es de color café casi claro (Soler y Soler, 2004). Las hojas se encuentran en la parte terminal de los tallos en forma de roseta, éstas se encuentran en forma de espiral, la venación de las hojas es paralela (característica de las monocotiledóneas), su margen es simple y son de color verde claro. Las flores son dioicas y presentan color blanco a amarillo claro, dispuestas en una inflorescencia que se presenta en primavera (Gilman y Watson, 1993). La inflorescencia de *Beaucarnea* es visitada por 46 insectos polinizadores según la investigación realizada en áreas de Tehuacán, Puebla (Cardel y col., 1997); en otros estudios que se realizaron en Tamaulipas se demostró que también es visitado por el coleóptero *Thrincopyge alacris* (Villalón y col., 1997). El fruto presenta un pedúnculo de 3 a 5 mm de largo de forma elipsoide a ligeramente obovado, 12 a 14 mm de largo, 9 a 10 mm de ancho, amarillo pálido. La semilla elipsoide y en gran parte ovoide, 3.5 a 4.5 mm de largo, 3 a 4 mm de ancho con lóbulo no bien marcado; testa escabrosa a liso, rojo a café (Contreras y col., 2008). Sus raíces son fibrosas y superficiales, prefieren lugares con alto drenaje de agua y poco arcilloso que no retenga humedad (Gilman y Watson, 1993).

2. 2. Usos del género *Beaucarnea*

Beaucarnea es un género que presenta una belleza ornamental y una alta demanda con este fin, siendo su uso principal en las zonas urbanas, su corteza presenta fisuras como la piel de los elefantes y en la base ésta engrosada, con

apariciencia de ser una pata de elefante, de ahí su nombre común. Las especies que integran este género son tolerantes a sequías, por lo que no requiere riegos frecuentes y cuidados especiales, por estas características presentan una gran demanda a nivel nacional e internacional; cabe señalar que son saqueadas de manera ilegal para su comercialización (Fuentes y col., 2006). Las especies de *B. recurvata* Lemaire, *B. gracilis* Lemaire y *B. pliabilis* Baker están consideradas como especies amenazadas (Fuentes y col., 2006; Bordehore y col., 2008).

Se han generado dos nuevas variedades de *B. recurvata* Lemaire que presentan dos colores, conocidas como variegaciones; presenta un verde intenso y un amarillo claro, en las hojas; de tal manera que el centro es amarillo y en los extremos es de color verde oscuro. Esta variegación se extienden desde la base de la hoja hasta la punta, formando tres líneas verde-amarillo-verde, esta variedad generada en Holanda (registrada en Estados Unidos), por ser diferente de las especies de este género (Cornelis, 2004). Cabe señalar que su propagación *in vitro* es exitosa.

En algunas regiones de México se utilizan las hojas para tejerlas y hacer cestos para diferentes usos domésticos (Soler y Soler, 2004). En zonas áridas los tallos se consumen, se cortan y tatemán, por ser suculentos y carnosos (Bordehore y col., 2008).

2. 3 Distribución de *Beaucarnea*

En México, la familia Nolinaceae presenta una gran diversidad ya que se distribuye en todo su territorio, y es conformado por el género *Beaucarnea* (Figura 1); distribuyéndose en Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (García-Mendoza y Galván, 1995).

Existen trabajos que presentan la demografía de *B. gracilis* en el Valle Tehuacán, Puebla, en donde se encuentra en un área de 900 km² con una densidad de 16.7 individuos/ha. La presencia de plántulas es muy baja debido a que son ingeridas por cabras o se marchitan por la sequía, o con las fuertes

lluvias las semillas son arrastradas por la corriente o ingeridas por los roedores. La mayoría de las plantas requiere de una planta nodriza como *Mimosa luisiana* Brandegee y *Castela tortuosa* Liebm. Debido al saqueo y el pastoreo, la destrucción del hábitat pone en riesgo la sobrevivencia de esta especie, debido a que son plantas de lento crecimiento y de ciclo de vida largo (Cardel y col., 1997).



Figura 1. Distribución del género *Beaucarnea* en México (Cardel y col., 1997)

2. 4. La propagación de los vegetales

Las plantas se propagan de dos maneras distintas: asexual y sexualmente. En la reproducción sexual se desarrolla una división celular meiótica para tener la mitad de la carga genética, estas células haploides gaméticas de diferentes progenitores, el polen y óvulo se combinan para asegurar la variación genética (Klug y Cummings, 1999). En el caso de la propagación asexual no hay un intercambio genético y las características que presentan son iguales a los

progenitores, pero en el cultivo de tejidos existe variación somaclonal, y se han encontrado casos de poliploidismo y aneuploidia a nivel celular, pudiendo existir rompimiento y re-arreglo cromosómico, así como mutaciones (George, 1993).

Dentro de las ventajas que tiene la reproducción sexual en los vegetales, es la variación genética de los nuevos organismos que pueden ser de interés para el hombre; asimismo, como adaptación a su entorno. La propagación asexual se utiliza para conservar dichas variaciones genéticas, es decir, no hay un intercambio entre dos progenitores, manteniendo las características de la planta madre y así evitar que por la recombinación genética se pierdan, como el color de la flor y calidad de frutos, etc. Este tipo de reproducción es muy utilizada en muchos cultivos para mantener y explotar las características genéticas que presenta alguna planta en especial (Hartmann y col., 2002).

2. 5. Las fitohormonas

Todas las plantas presentan fitohormonas, las cuales son promotoras para el desarrollo y crecimiento pero pueden ser inhibidas ó reguladas por otras (Pimienta y col., 2006). Estas se encuentran en el meristemo apical, meristemo radicular, en los frutos para su maduración, así como para la abscisión de las hojas y frutos, también actúan en la maduración y el desarrollo del embrión. Existen muchos grupos de fitohormonas, entre las que se conoce más su funcionamiento son las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno. Dentro del cultivo *in vitro* se utilizan, pero como no tienen como origen la planta y se adicionan al medio, se les da el nombre de reguladores de crecimiento y éstos son esenciales para las técnicas de cultivo *in vitro*.

La palabra auxina proviene del griego *auxein* que significa crecer, es una fitohormona sintetizada por las plantas en las células del meristemo apical del tallo y ramas, de estas partes es transportada a través de las células de las plántulas o por el xilema y floema en plantas ya desarrolladas (Rojas y Rovalo, 1979). Una de sus funciones en las células es promover el ablandamiento de la

pared celular (Flores-Vindas, 1999). Intervienen en la división celular, elongación de tallos, coleóptilo, dominancia apical, inducción de enraizamiento, diferenciación del tejido vascular, desarrollo de frutos y movimientos trópicos como el movimiento de las ramas hacia la luz; inhibe el sitio de abscisión de hojas y la caída de los frutos (Pimienta y col., 2006).

Las citocininas son derivados de adenina, estas promueven la división celular, uno de sus efectos es retrasar la senescencia o el envejecimiento en los órganos vegetales, induce el crecimiento en tallos y ramas, rompe la dominancia apical como también rompe el letargo en yemas y semillas (Rojas y Rovalo, 1979). Esta fitohormona se caracteriza por que juega un papel importante en la relación auxinas-citocininas, para la formación de brotes promoviendo el desarrollo de los meristemos axilares, o la formación de raíces, todo depende de la cantidad de cada una de las fitohormonas (Pimienta y col., 2006). Su actividad es alta en desarrollo de frutos y semillas pero disminuye cuando las semillas maduran (Hartmann y col., 2002). En estudios recientes demuestran que actúa en el transporte de nutrientes hacia las hojas, como también la maduración de los cloroplastos (Soberón y col., 2005).

Las giberelinas se sintetizan en el ápice de tallos, hojas jóvenes y en la raíz. Actúan en la inducción de producción de la amilasa, inducen la partenocarpia y buen desarrollo del fruto, teniendo efectos en la sexualidad aumentando el número de flores masculinas (Rojas y Rovalo, 1979). Las giberelinas comprenden una clase de fitohormonas muy directamente relacionadas al control y promoción de la germinación de semilla, la aplicación exógena de giberelinas estimula la germinación (Hartmann y col., 2002). Influyen en el crecimiento de la planta, haciendo que la distancia entre los nudos sea más grande, tanto en tallos como en raíz hojas y pedicelos foliares (Pimienta y col., 2006).

El etileno es un gas natural que proviene del aminoácido metionina, tiene como funciones: incrementar la permeabilidad la membrana celular, bloquea el

transporte de auxinas y puede inducir la floración en plantas que crecen fuera del fotoperiodo (Rojas y Rovalo, 1979). Se produce en casi todos los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción depende del tipo de tejido y de su estadio y desarrollo; en general las regiones meristemáticas son las más activas en la producción. Sin embargo, también se incrementa durante la abscisión foliar, senescencia de las flores y maduración de frutos (Soberón y col., 2005). Esta fitohormona que se produce de manera natural está involucrada en muchos aspectos de el crecimiento de las planta (Hartmann y col., 2002). El etileno también influye en engrosamiento del tallo en plantas altas de tallo delgado, con el movimiento que genera el viento estimula la producción del etileno y la planta comienza a ensanchar el tallo, esto actúa inhibiendo el alargamiento de tallos y raíces haciendo una expansión radicular (Pimienta y col., 2006). También influye en la maduración de frutos al regular la cantidad de etileno puede alargar la maduración de algunas frutas (Pimienta y col., 2006). Otras de sus funciones es inhibir el crecimiento de raíz y promueve el crecimiento de las raíces adventicias, como también promueve la senescencia en las hojas y afectando en la abscisión tanto en las hojas como en los frutos (Soberón y col., 2005)

2. 6. El cultivo *in vitro*

De acuerdo con Castillo (2004) se describen cinco etapas en el cultivo *in vitro*, estas son:

Etapa 0 preparativa, la selección de material vegetativo y sometimiento del material a tratamientos de desinfección para disminuir la contaminación, el objetivo es ser más eficientes en el establecimiento.

Etapa I establecimiento o iniciación de los cultivos, la finalidad es establecer cultivos libres de bacterias y hongos con los cuales iniciar la propagación.

Etapa II multiplicación, la finalidad es garantizar la producción de brotes y la homogeneidad genética, y es la etapa más importante.

Etapa III enraizamiento, la finalidad es preparar a las plántulas para condiciones de suelo.

Etapa IV aclimatación, es la última etapa y la finalidad es tener plantas capaces de desarrollarse en las condiciones normales de cultivo.

Dentro del cultivo *in vitro* se utilizan diferentes métodos, de acuerdo al tipo de planta y a las necesidades de cada cultivo, que son: proliferación de yemas axilares, organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática

2. 6. 1. Proliferación de yemas axilares

La proliferación de yemas axilares es el método más utilizado dentro del cultivo *in vitro* por presentar alta producción, las plantas se mantienen uniformes sin variación somaclonal que en algunos tipos de cultivo es necesario mantener. Al cultivar los meristemas por este tipo de técnica, se obtienen plantas libres de virus debido a que no pueden llegar hasta el meristemo por que carece de vasos de conducción. Éste método consiste en eliminar la dominancia apical

dada por las auxinas, al adicionar un regulador de crecimiento del grupo de las citocininas para estimular la proliferación de las yemas axilares (George, 1993).

2. 6. 2. Organogénesis

En el método de organogénesis se produce cualquier tipo de órgano como raíz ú hoja, pero no una planta completa; todo esto se debe a la totipotencia de las células vegetales (Hartmann y col., 2002). Este método utiliza dos vías: directa e indirecta.

La organogénesis directa es la formación de órganos a partir de células competentes determinadas para este fin, como el caso de la familia Crassulaceae, que sus hojas son capaces de formar órganos sin la adición de reguladores de crecimiento (Torres y col., 2006).

La organogénesis indirecta consiste en que a partir de células no diferenciadas como callo, se presenten brotes, raíces o algún otro órgano, todo esto ocurre por la adición al medio de cultivo de reguladores de crecimiento, dependiendo de las condiciones endógenas de los tejidos y del regulador de crecimiento que se adicione, la diferenciación puede variar para cada tipo de planta (Dodds y Roberts, 1985)

2. 6. 3. Embriogénesis somática

La embriogénesis ocurre de manera natural, algunas plantas tienen tendencias de poliembriogénesis, esto ocurre cuando en la fertilización cigótica el embrión se divide en uno o más embriones, también sucede en algunas hojas de las plantas (George, 1993). La embriogénesis somática *in vitro* puede ser en dos vías, directa o indirecta formando callo. Un tejido se induce a la formación de callo con la presencia de auxinas, estos pueden formar los embriones o también se pueden desarrollar en cultivos en suspensión. Dicho método presenta

variaciones genéticas que puede ser una desventaja para algunos cultivos en los que se quiera mantener estables sus características; pero se utiliza para el mejoramiento genético (George, 1993).

2. 6. 4. Adaptación *ex vitro*

En el cultivo *in vitro*, los vegetales se encuentran casi siempre con todos los requerimientos de nutrientes necesarios y humedad para su desarrollo, y normalmente no se encuentran bajo algún estrés, lo que en condiciones normales si ocurre. Las plantas que se adaptan a condiciones *ex vitro* necesitan que sea gradual para evitar que mueran en este cambio. Al modificar el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* sufren estrés por el incremento de la intensidad de luz, nutrientes y humedad; para que estos cambios no afecten a la planta, es necesario cuidar estos aspectos, tratando de mantener húmedo su ambiente donde se mantengan, el sustrato debe proporcionarle los nutrientes necesarios y un buen drenaje, es indispensable que las plantas tengan luz, ya que las plantas de *in vitro* no soportan el sol directo, la exposición al sol tiene que ser gradual para no dañar las plantas (Torres y col., 2006).

2. 7. Ventajas y desventajas de técnicas de cultivo *in vitro* vía medios líquido y sólido

Las ventajas que presenta el medio sólido son: el material vegetativo es fácil de observar y recuperar, además las plántulas o brotes conservan la misma orientación en todo el cultivo, por lo cual se obtienen brotes y raíces de forma más ordenada, y en el cultivo de callos las células no se desprenden. Las desventajas de los medios sólidos son: algunos agaros contiene inhibidores de sustancias que pueden reducir las tasas de crecimiento, también algunas plantas presentan exudados tóxicos y no se difunden fuera con rapidez. Cuando las plántulas se retiran de los contenedores es necesario lavar las raíces para desprender todo el medio de cultivo, los contenedores deben ser lavados para su reutilización, por lo que requiere de mucho tiempo (George, 1993).

Los medios líquidos se utilizan para cultivos en suspensión, de callos y órganos. Estos tienen que estar en movimiento y los tejidos en constante aireación. Las desventajas que presenta este medio de cultivos en medios líquidos son: algunos tejidos que son frágiles y se pueden dañar con facilidad por la agitación y el movimiento en el que se encuentran, la multiplicación de brotes se dificulta porque los explantes están totalmente sumergidos en el medio de cultivo y entorpecen el desarrollo (George, 1993). Actualmente existen diferentes contenedores que pretenden mejorar y hacer eficientes los cultivos en medio líquido, evitando que los explantes o tejidos permanezcan totalmente sumergidos en el medio, sólo teniendo contacto en periodos muy cortos con el medio de cultivo, a este tipo de técnica se le llama Sistema de Inmersión Temporal (Colmenares y Giménez, 2003).

2. 8. Propagación de *Beaucarnea*

2. 8. 1. Propagación tradicional

La mayoría de especies de *Beaucarnea* se reproducen por medio de semillas, en donde el porcentaje de germinación es muy alto y no presentan ningún problema en esta etapa. En las plántulas obtenidas a partir de semillas su crecimiento es lento; casi toda la semilla que se utiliza proviene de zonas naturales, lo cual daña las poblaciones, reduciendo la capacidad de regeneración natural, las plantas *Beaucarnea* son muy longevas y de lento crecimiento, para llegar a la etapa de reproducción trascurren varios años y en esta etapa sólo florecen anualmente, además las semillas tienen depredadores como los roedores (Cardel y col., 1997). También se reproduce de manera vegetativa (asexual), en plantas adultas se logra cortando la parte terminal o a partir de un brote nuevo que generalmente se obtiene cuando el meristemo apical se daña por medio de podas, en la parte del corte se coloca un enraizador para estimular la producción de raíz; posteriormente, se coloca en un sustrato que no retenga mucha humedad para que no se pudra, con este

tipo de propagación las plantas se desarrollan relativamente más rápido, sin embargo no es muy utilizado, debido a que las especies de este género generalmente presenta un solo tallo en etapas jóvenes y tardan varios meses en desarrollarlos.

2. 8. 2. Propagación *in vitro* de *Beaucarnea*

En algunos estudios sobre cultivo *in vitro* de *Beaucarnea* se ha analizado la influencia de la fuente de nitrógeno para la organogénesis utilizando medio MS (Murashige y Skoog, 1962), y suplementado con los reguladores de crecimiento, 6-Bencilaminopurina (BA) en concentración de 2.2 mg/L y ácido naftalenacético (ANA) en 0.18 mg/L, 3 % de sacarosa y 0.2 % de Gelrite®. Modificando la relación de amonio y nitrato se obtienen brotes más grandes y robustos, se reportan buenos resultados, al aportar un total 2.52 mg/L de nitrógeno, dicha cantidad favorece la diferenciación y el crecimiento de brotes (Fuentes y col., 2006).

Se han establecido investigaciones para desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación mediante organogénesis directa de *B. gracilis* y *B. recurvata*, empleado el medio basal MS suplementado de 5 mg/L de BA que indujo un promedio de 8.2 brotes de *B. gracilis* y 11.1 brotes de *B. recurvata*. Para la inducción del enraizamiento se utilizó medio basal MS con 1 g/L de carbón activado, y como resultados se obtuvo una tasa de enraizamiento del 61 al 100 % en *B. gracilis* y 83 al 100 % en *B. recurvata* a los tres meses (Osorio y Mata-Rosa, 2005).

Existen estudios sobre el efecto de beta-ciclodextrina que es un oligosacárido cíclico, para enraizamiento *in vitro*. Cabe señalar que el corte no induce raíces adventicias por lo que se investigó los requerimientos para una rápida estimulación del enraizamiento. Como primer paso se propaga el material

vegetativo *in vitro* utilizado medio basal MS suplementado con 1 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) donde el promedio de brotes obtenidos por explante fue de seis brotes; para el enraizamiento *in vitro* se utilizó medio MS al 50 % de las sales, más 2.0 mg/L de beta-ciclodextrina y 0.95 mg/L de AIB, con una tasa de 100 % de enraizamiento (Bettaieb y col., 2008).

Por otra parte se reportaron estudios de senescencia experimental y viabilidad en *Beaucarnea* sp para asegurar la conservación. Las semillas de una región árida de Puebla, se trataron y se evaluaron cada 24 h por un periodo de 15 d donde se observó la pérdida progresiva de viabilidad. Para analizar la viabilidad se germinaron *in vitro*, con semillas que eran viables se obtuvieron buenos resultados utilizando los reguladores de crecimiento ANA a una concentración de 1 mg/L y BA con 2 mg/L, produciendo en la parte basal brotes y callo (Espinosa y col., 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Beaucarnea recurvata Lemaire (Nolinaceae) se considera una planta con gran belleza ornamental que presenta facilidad para la adaptación; las plantas adultas y jóvenes, así como las semillas son recolectadas de áreas naturales, lo que ha afectado la población, este género se encuentra en carácter de amenazado NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002); particularmente, las especies de *B. plibilis* y *B. recurvata*. Estas plantas tienen demanda en el mercado como ornamental a nivel nacional y en el extranjero, también son explotadas sus hojas para la fabricación de cestos entre otros utensilios. Es por ello que es necesario establecer metodologías alternativas para su propagación masiva, mediante el uso de herramientas biotecnológicas, como es el cultivo *in vitro*, en el que existen diferentes técnicas para hacer más eficiente la propagación. Con la aplicación de los anteriores métodos de propagación, se pretende ofrecer una herramienta que ayude a cubrir la demanda de esta planta ornamental, y así contribuir a mantener este recurso natural.

4. HIPÓTESIS

Es posible establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (Nolinaceae)) mediante la proliferación de yemas axilares.

5. OBJETIVOS

5. 1. Objetivo general

Desarrollar una metodología eficiente para la propagación *in vitro* de *Beaucarnea recurvata* Lemaire (Nolinaceae)

5. 2. Objetivos particulares

- i. Evaluar diferentes dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento, 6-benciladenina (BA) y ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) para el desarrollo de yemas axilares.
- ii. Comparar dos tipos de contenedores bajo sistemas de inmersión temporal y el cultivo en medio sólido para *B. recurvata* en la proliferación de yemas axilares.
- iii. Determinar el uso de diferentes suplementos para el enraizamiento de *B. recurvata*
- iv. Evaluar diversos sustratos en la adaptación *ex vitro* en invernadero de *B. recurvata*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetativo se estableció a partir de semillas obtenidas en el vivero Navaflor ubicado en el municipio de Zapopan, Jalisco; el trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Producción Agrícola del CUCBA. Para el establecimiento se lavaron las semillas con jabón líquido comercial y se enjuagaron con agua corriente, después se transfirieron a la campana de flujo laminar para ser desinfectadas con hipoclorito de sodio (cloro Cloralex® que se encuentra a una concentración del 6 %) se tomaron 20 mL que fueron diluidos en 50 mL de agua previamente esterilizada y se colocaron las semillas por 8 min con agitación constante, posteriormente se cambiaron dos veces a otros recipientes para enjuagarlas con agua estéril por un período de 3 min, ya desinfectadas se sembraron en frascos con medio MS para su germinación.

El agua y medios de cultivos se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 1.2 kg/cm² por 15 min.

Para todo el trabajo de propagación *in vitro* se ajustaron los medios de cultivo a un pH de 5.8 ± 0.05.

6. 1. Proliferación de yemas axilares

Se utilizó como medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se adicionaron 30 g/L de sacarosa y se evaluaron las combinaciones de los reguladores de crecimiento BA (benciladenina) en concentraciones de 0, 2.5, 5.0 y 7.5 mg/L y de 2,4-D (ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético) en concentraciones de 0, 0.15 y 0.30 mg/L. Para solidificar los medios de cultivo se utilizaron 8 g/L de agar, el cual se licuó en un horno de microondas para así obtener una mezcla homogénea, posteriormente, se vaciaron a los frascos de vidrio tipo alimento infantil de 100 mL y se colocó en el autoclave para su esterilización. Se evaluó la cantidad de brotes producidos por explantes con un diseño experimental bifactorial completamente al azar.

6. 2. Producción de brotes por yemas axilares en diferentes contenedores

Se utilizó el medio de cultivo MS, suplementado con la mejor combinación de reguladores que se obtuvo en el experimento previo. Se utilizaron dos técnicas diferentes, medios sólidos en el que se manejaron frascos de capacidad de 100 mL, contenedores de plástico de capacidad de 500 mL; y de inmersión temporal en el que se utilizaron los biorreactores Rita[®] y Orbitabion[®]. Para solidificar los medios de cultivo se usó 8 g/L de agar ; se vaciaron 25 mL a los frascos de vidrio y se les colocó un explante; en los contenedores de plástico se les colocó 75 mL de medio de cultivo y se establecieron tres explantes. En la técnica de inmersión temporal, a los biorreactores Orbitabion[®] de 1000 mL de capacidad se adicionaron 75 mL de medio líquido en el que se colocaron tres explantes; a los de 250 mL de capacidad se agregaron 25 mL de medio líquido con un solo explante, en los Rita[®] de 1000 mL de capacidad se añadieron 150 mL de medio de cultivo y se incubaron seis explantes. En cada contenedor se colocó una relación de un explante por cada 25 mL de medio de cultivo, y para cada tratamiento se realizaron diez repeticiones. Al utilizar la técnica de inmersión temporal, los Rita[®] se conectaron a un compresor el cual introdujo aire estéril por un período de 1 min, impregnando los explante con el medio, una vez a la semana, para el caso de los Orbitabion[®] estos se agitaron manualmente con la misma frecuencia hasta que la malla junto con los tejidos quedaron totalmente húmedos. Se evaluó la cantidad de brotes producidos por explantes utilizando un modelo estadístico unifactorial completamente al azar.

6. 3. Estimulación de raíz

Para la estimulación de raíz se utilizaron brotes de 140 d en medio basal MS más diversos suplementos, fueron evaluados ocho tratamientos:

1. 8 g/L de agar.
2. 2 g/L de Phytigel® SIGMA Cat. P8169.
3. 2 g/L de Phytigel®, 2 g/L de carbón activado.
4. 4 g/L de Phytigel®.
5. 2 g/L de Phytigel®, 40 mg/L de hemisulfato de adenina.
6. 2 g/L de Phytigel®, 80 mg/L de hemisulfato de adenina.
7. 4 g/L de Phytigel®, 40 mg/L de hemisulfato de adenina.
8. 2 g/L de Phytigel®, 1 mg/L de AIB (ácido índol-butírico).

Se evaluó la cantidad de raíces producidas por explantes y se utilizó un modelo estadístico unifactorial completamente al azar.

6. 4. Incubación del material vegetativo

Todo el material de los experimentos de proliferación de yemas axilares, comparación de diferentes contenedores y de estimulación de producción de raíz de *B. recurvata* se trasladó a incubación. Se utilizó una temperatura de $27 \pm 2^\circ$ C, intensidad lumínica de 1500 luxes y un fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

6. 5. Aclimatación en el invernadero

Para la aclimatación en el invernadero, se tomaron las plántulas del medio de enraizamiento de 50 d, se lavaron para quitar los residuos de medio de cultivo y así evitar la proliferación de microorganismos, ya lavados se colocaron en charolas. Los factores que se evaluaron fueron los sustratos en tres diferentes combinaciones de agrolita, turba y estiércol de borrego (EB); la fertilización con

lixiviado de vermicomposta y sin lixiviado, plantas que presenten raíz y plantas que no presenten. Las tres combinaciones de sustratos fueron 40% de turba + 40% EB + 20% de agrolita; 30% de turba + 30% EB + 40% de agrolita; 20% de turba + 20% EB + 60% de agrolita. Para la fertilización se usaron tres dosis 0, 5 y 10 mL de lixiviado vermicomposta, el que se preparó 10 mL/L de agua. Para cada factor se establecieron cinco repeticiones. Las charolas se colocaron en un invernadero con ambiente controlado, a una temperatura de 25 a 35 °C y una humedad relativa del 75 a 85 %, con estas condiciones se evitó el estrés por el cambio de cultivo *in vitro* a *ex vitro*. Se evaluó el grosor de la base de cada planta así como el número y la longitud de las hojas, se utilizó un modelo estadístico trifactorial completamente al azar.

6. 6. Análisis estadístico

En los experimentos, los datos de número de brotes, como la cantidad de raíz el grosor del tallo, longitud de la hoja y el número de éstas, se analizaron con el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0[®], se determinó su significancia estadística mediante una ANVA y la comparación de medias en cada uno de los ensayos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. 1. Proliferación de yemas axilares

Al transcurrir 65 d del establecimiento de los explantes, estadísticamente se observó significancia para el factor BA ($p=0.0373$), en el caso de 2,4-D no presentó significancia estadística ($p=0.8504$). Al adicionar el regulador de crecimiento BA se favorece la proliferación de yemas axilares, fueron estadísticamente iguales las dosis 2.5, 5 y 7.5 mg/L (Cuadro 1). Se demostró que cualquiera de estas dosis puede estimular la proliferación de yemas axilares de los explantes (Figura 2A), la dosis que presenta un promedio más alto en la producción de brotes es la de 5 mg/L (10.93 brotes por explante). El BA es un regulador de crecimiento que pertenece al grupo de las citocininas, una de sus funciones es romper el letargo en las yemas axilares (Rojas, 1979), es por eso que al contener cualquier dosis de BA se obtuvieron brotes en *B. recurvata*. Cada especie de planta en el cultivo *in vitro* varía su respuesta a los reguladores de crecimiento por su concentración interna de fitohormonas (Dodds y Roberts, 1985). En la combinación de estos reguladores (BA y 2,4-D) con *Agave victoriae-reginae* Moore, incluso pueden ayudar a la formación de embriones somáticos y brotes en callo (Martínez-Palacios y col., 2004).

Este experimento coincide con lo reportado por Osorio y Mata-Rosas (2005), quienes utilizaron esta dosis para la proliferación de yemas axilares de *B. gracilis*. Estos resultados difieren a los de Espinosa y col. (2006), quienes adicionaron 2 mg/L de BA y 1 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) que obtuvo formación de brotes y callo sólo en la parte basal. Lo que puede deberse al modo diferente de actuar las distintas dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento, así como a los genotipos utilizados en los experimentos.

Cuadro 1. Proliferación de yemas axilares de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 65 d del establecimiento *in vitro*.

Cantidad de BA mg/L	Número promedio de brotes/explante	Grupos DMS
5.0 mg/L	10.93	a
2.5 mg/L	8.12	a
7.5 mg/L	5.82	a b
0.0 mg/L	0.73	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

En el experimento de proliferación de yemas axilares, los meristemos se estimularon para dar la formación de un brote vigoroso y de buen tamaño (Figura 2A), la combinación de los reguladores de crecimiento generó la formación de dos tipos de callos; uno de textura suave y coloración cristalina (Figura 2B) y otro duro de color blanco (Figura 2C). En otro tratamiento donde se dio la proliferación de yemas axilares, los brotes se deformaron debido a que los medios de cultivo contenían la auxinas 2,4-D (Figura 2D). También se encontró desarrollo de organogénesis indirecta, ya que se formó callo en la parte basal de las plantas y posteriormente los brotes (Figura 2E,F y G).

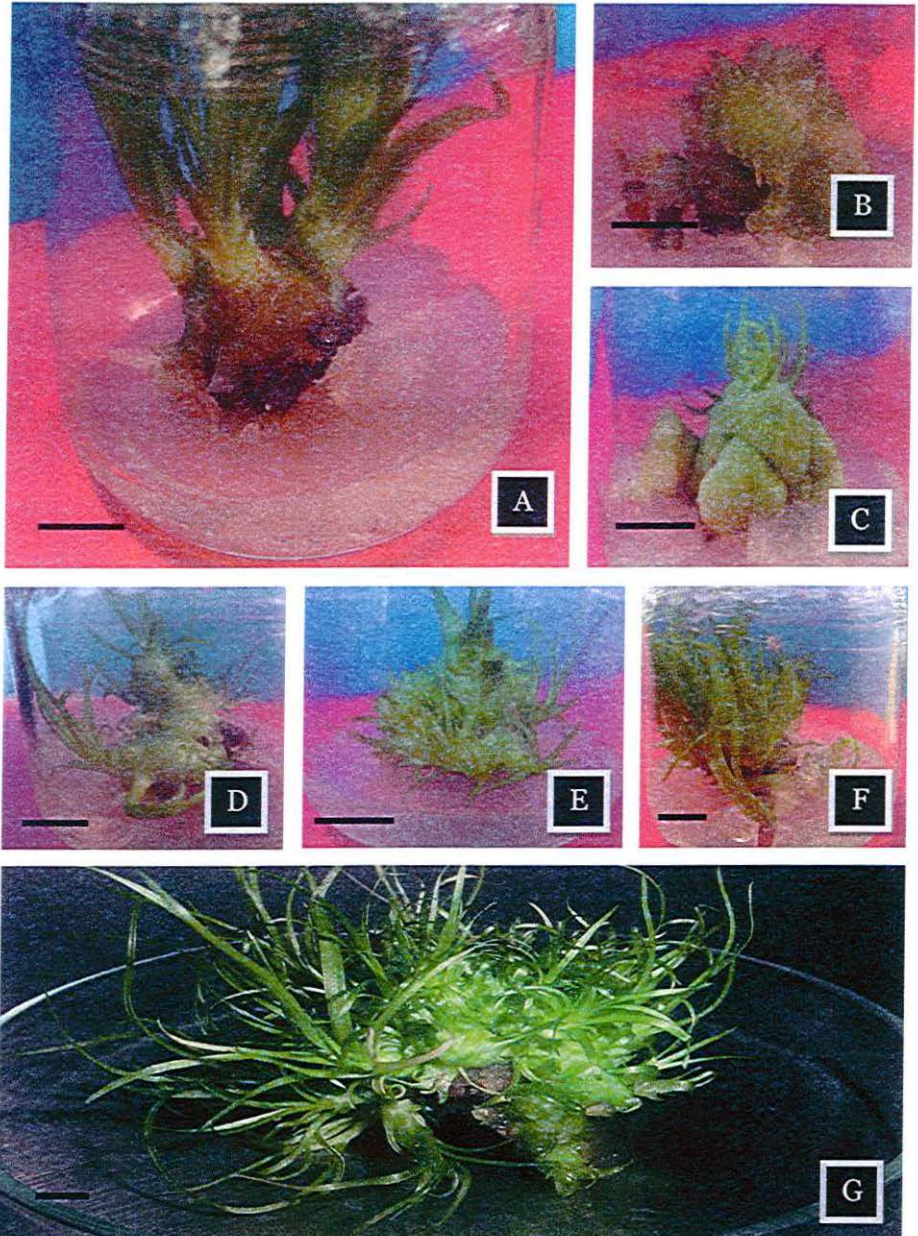


Figura 2. Comportamiento de los tratamientos de la proliferación de yemas axilares. Barra = 1 cm. A) proliferación de yemas axilares. B) callo de color cristalino C) callo de textura dura y blanco. D) brotes deformes. E), F) y G) organogénesis indirecta.

7. 2. Producción de brotes por yemas axilares en diferentes contenedores

Para analizar los cinco tratamientos se realizaron cuatro evaluaciones, todas presentaron alta significancia a los 30, 50 y 70 d ($p=0.0000$) y a los 140 d ($p=0.0019$).

Cuadro 2. Proliferación de yemas axilares de *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes contenedores a los 30 d.

Tratamiento	Número promedio de brotes/explante	Grupos DMS
1. Orbitabión® 1 L con medio líquido	2.63	a
2. Contenedores de plástico 500 mL con medio sólido	2.50	a
5. Frascos 100 mL con medio sólido	1.90	a
3. Orbitabión® 250 mL con medio líquido	1.20	a b
4. Ritas® 1 L con medio líquido	0.65	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Se destaca que los tratamientos con Rita® y Orbitabión® de 250 mL presentaron el promedio más bajo de número de brotes en las cuatro evaluaciones y los demás tratamientos (contenedores de plástico, frascos y Orbitabión® de 1000 mL) fueron estadísticamente iguales (Cuadros 2, 3, 4 y 5). En los Rita® existe el intercambio de aire y los tejidos no sufren ningún estrés por esta causa, en los demás contenedores que se utilizaron no existía este intercambio, por lo que a los brotes de *B. recurvata* les favorece esta carencia de intercambio gaseoso para la proliferación de yemas axilares. Se observó que al no poner en funcionamiento los Rita® y al no existir el intercambio de aire, los explantes comenzaron a producir brotes.

Cuadro 3. Proliferación de yemas axilares de *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes contenedores a los 50 d.

Tratamiento	Número promedio de brotes/explante	Grupos DMS
2. Contenedores de plástico 500 mL con medio sólido	3.63	a
1. Orbitabión® 1 L con medio líquido	3.63	a
5. Frascos 100 mL con medio sólido	2.80	a b
3. Orbitabión® 250 mL con medio líquido	2.30	b
4. Rita® 1 L con medio líquido	0.85	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Al aumentar el número de días el promedio de brotes aumentó gradualmente, y presentó un promedio más alto el tratamiento contenedores de plástico (Figura 3), en tres de las evaluaciones sólo a los 30 d presentó un promedio menor que el tratamiento Orbitabion® de 1000 mL (Cuadro 2).

Cuadro 4. Proliferación de yemas axilares de *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes contenedores a los 70 d.

Tratamiento	Número promedio de brotes/explante	Grupos DMS
2. Contenedores de plástico con medio sólido	5.06	a
5. Frascos con medio sólido	4.40	a
1. Orbitabión® 1 con medio líquido	4.13	a
3. Orbitabión® 250 mL con medio líquido	3.00	a b
4. Rita® con medio líquido	1.11	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Estos resultados difieren con lo obtenido por Colmenares y Giménez (2003) en plátano (*Musa spp*), ellos realizaron una comparación con las técnicas de inmersión temporal y los medios sólidos para la proliferación de yemas axilares y obtuvieron un promedio más alto de brotes al utilizar los dispositivos Rita[®]. Es conveniente mencionar que el plátano es una planta de climas húmedos y la fisiología es un tanto diferente en su comportamiento dentro de los sistemas de inmersión temporal.

Cuadro 5. Proliferación de yemas axilares de *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes contenedores a los 140 d.

Tratamiento	Número promedio de brotes/explante	Grupos DMS
2.Contenedores de plástico 500 ml con medio sólido	9.70	a
1.Orbitación [®] 1 L con medio líquido	8.50	a
5.Frascos 100 mL con medio sólido	6.80	a
3.Orbitación [®] 250 mL con medio líquido	6.70	a b
4.Rita [®] 1 L con medio líquido	3.00	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Al transcurso del tiempo se observa que el número de brotes aumenta gradualmente en cada tratamiento, notando que el promedio más alto se obtuvo en la última evaluación, es decir es viable y pudiera ser estratégico dentro del cultivo *in vitro* de *B. recurvata* para obtener más brotes, dejar que el cultivo dure 140 d en los contenedores de plástico con medio sólido (Figura 3).

El desarrollo de los brotes es mayor en los contenedores de plástico (Figura 4A), también se presenta con una dosis alta de los reguladores de crecimiento dándoles a las hojas, tallos y raíz apariencia cristalina (Figura 4B y C). En los

frascos los brotes se desarrollaron pero el promedio de número de brotes fue menor (Figura 4D). Los Rita[®] funcionan con compresor que inyecta aire, y así el medio de cultivo impregna los explantes (Figura 4E), en los Rita[®] se produjo un menor número de brotes y de menor tamaño (Figura 4F), el desarrollo de los brotes en los Orbitabion[®] tanto de 250 mL como de 1000 mL fue bueno pero al paso del tiempo se vitrificaban. Torres y col. (2006) señalan que la vitrificación es una anomalía fisiológica que aparece en las plantas cuando se dispone de una gran cantidad de agua o una baja concentración de agar en los medios de cultivos. Por lo cual hay que disminuir la frecuencia de inmersión.

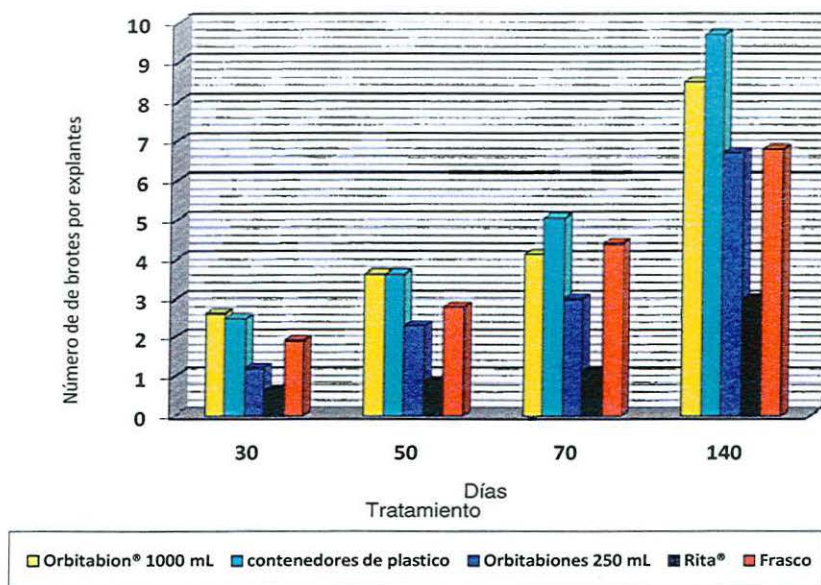


Figura 3. Efecto de los tratamientos entre los 30 y 140 d

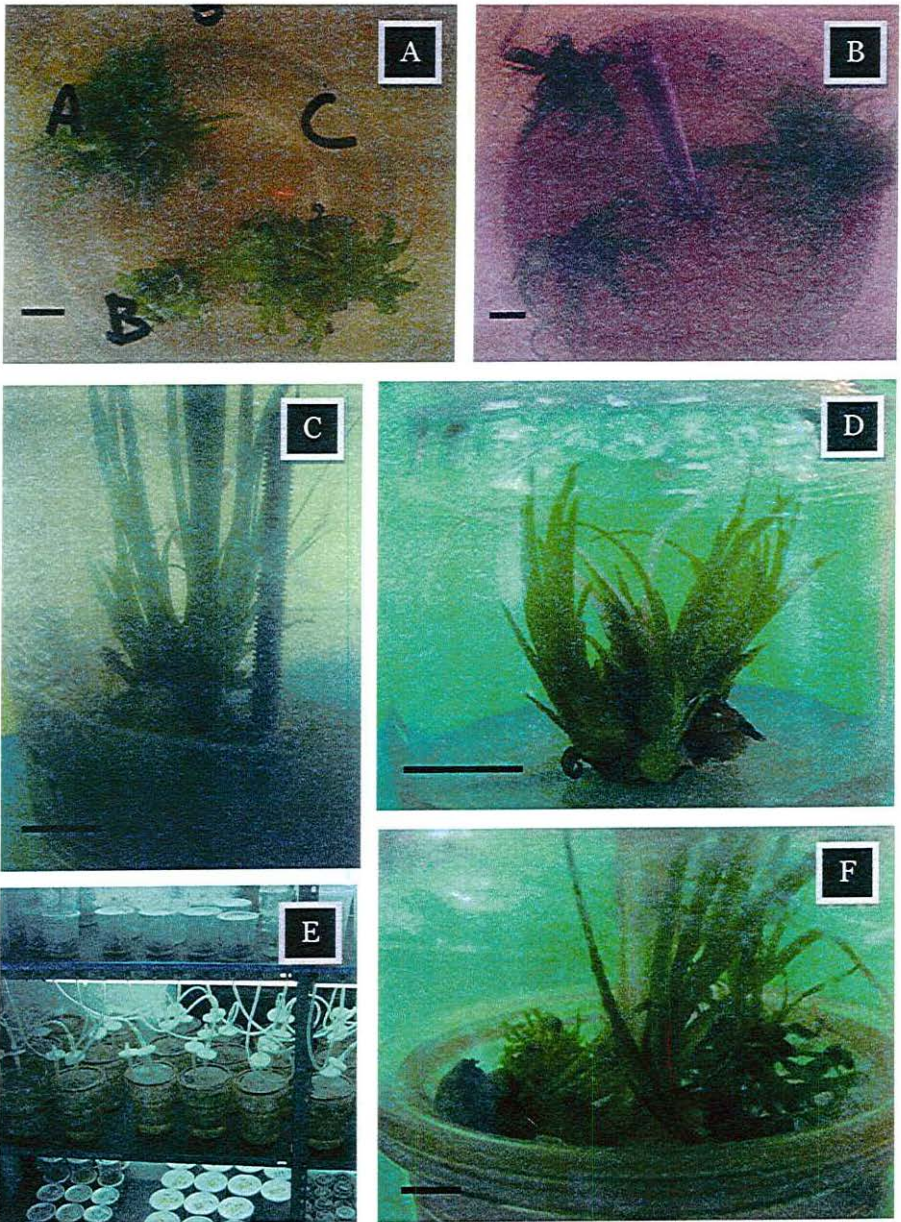


Figura 4. Cultivo *in vitro* de *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes contenedores. Barra = 1 cm A) contenedores de plástico 500 mL. B) Orbitabion® 1000 mL. C) Orbitabion® de 250 mL. D) frasco de 100 mL. E) funcionamiento de los Rita®. F) Rita®.

7. 3. Estimulación de raíz *in vitro*

Los resultados obtenidos en la estimulación de raíces a los 30 y 50 d son altamente significativos ($p=0.0000$). Al utilizar ácido índol-butírico AIB el número de raíces es estadísticamente mayor tanto a los 30 y 50 d, los demás tratamientos son estadísticamente iguales, resaltando que el AIB influye directamente en la estimulación de raíz. Al realizar una comparación entre el tratamiento ocho que contiene 2 g/L de Phytigel® + 1mg/L de AIB y el tratamiento dos, compuesto de 2 g/L de Phytigel®, el tratamiento dos, presenta una media menor (1.90) que el tratamiento ocho (6.60) en la producción de raíz (Cuadros 6 y 7). Siendo AIB una auxina, esta tiene efecto para la estimulación en la producción de raíz como lo señala Pimienta y col. (2006), es por ello que el tratamiento ocho presentó un promedio mayor.

Cuadro 6. Enraizamiento de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 30 d del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Número promedio de raíz/explante	Grupos DMS
8. 2 g/L de Phytigel®, 1mg/L de ácido índol-butírico.	4.20	a
5. 2 g/L de Phytigel®, 40 mg/L de hemisulfato de adenina.	1.00	b
2. 2 g/L de Phytigel®.	1.90	b
7. 4 g/L de Phytigel®, 40 mg/L de hemisulfato de adenina.	0.60	b
1. 8 g/L de agar.	0.50	b
3. 2 g/L de Phytigel®, 2 g/L de carbón activado.	0.40	b
6. 2 g/L de Phytigel®, 80 mg/L de hemisulfato de adenina	0.30	b
4. 4 g/L de Phytigel®.	0.30	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Estos resultados difieren a lo obtenido por Bettaieb y col. (2008) que estimularon la producción de raíz de *B. recurvata*, para ello utilizaron medio basal MS al 50 % suplementado con beta-ciclodextrina 2.03 mg/L y AIB 0.95 mg/L lo que produjo un porcentaje del 100 % del enraizamiento; sin embargo, ellos atribuyen la estimulación de raíz solamente a beta-ciclodextrina. En este experimento se demuestra que el regulador de crecimiento AIB ejerce una estimulación muy alta sobre la producción de raíz (Cuadro 7).

Cuadro 7. Enraizamiento de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 50 d del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Número promedio de raíz/explante	Grupos DMS
8. 2 g/L de Phytigel [®] , 1mg/L de ácido índol-butírico.	6.60	a
6. 2 g/L de Phytigel [®] , 80 mg/L de hemisulfato de adenina.	2.11	b
5. 2 g/L de Phytigel [®] , 40 mg/L de hemisulfato de adenina.	1.90	b
2. 2 g/L de Phytigel [®] .	1.60	b
1. 8 g/L de agar	1.40	b
4. 4 g/L de Phytigel [®] .	1.11	b
3. 2 g/L de Phytigel [®] , 2 g/L de carbón activado.	1 00	b
7. 4 g/L de Phytigel [®] , 40 mg/L de hemisulfato de adenina.	0.70	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Para el presente experimento los brotes, se prepararon y colocaron en los tubos de ensayo (Figura 5A). Cuando se utilizó agar o Phytigel[®] el crecimiento de la raíz se observó con facilidad (Figura 5B), cuando tenían carbón activado, no fue posible observar la raíz, sólo cuando tocaron fondo en los tubos de ensayo (Figura 5C), estos se colocaron en gradillas para su mejor manejo (Figura 5D).

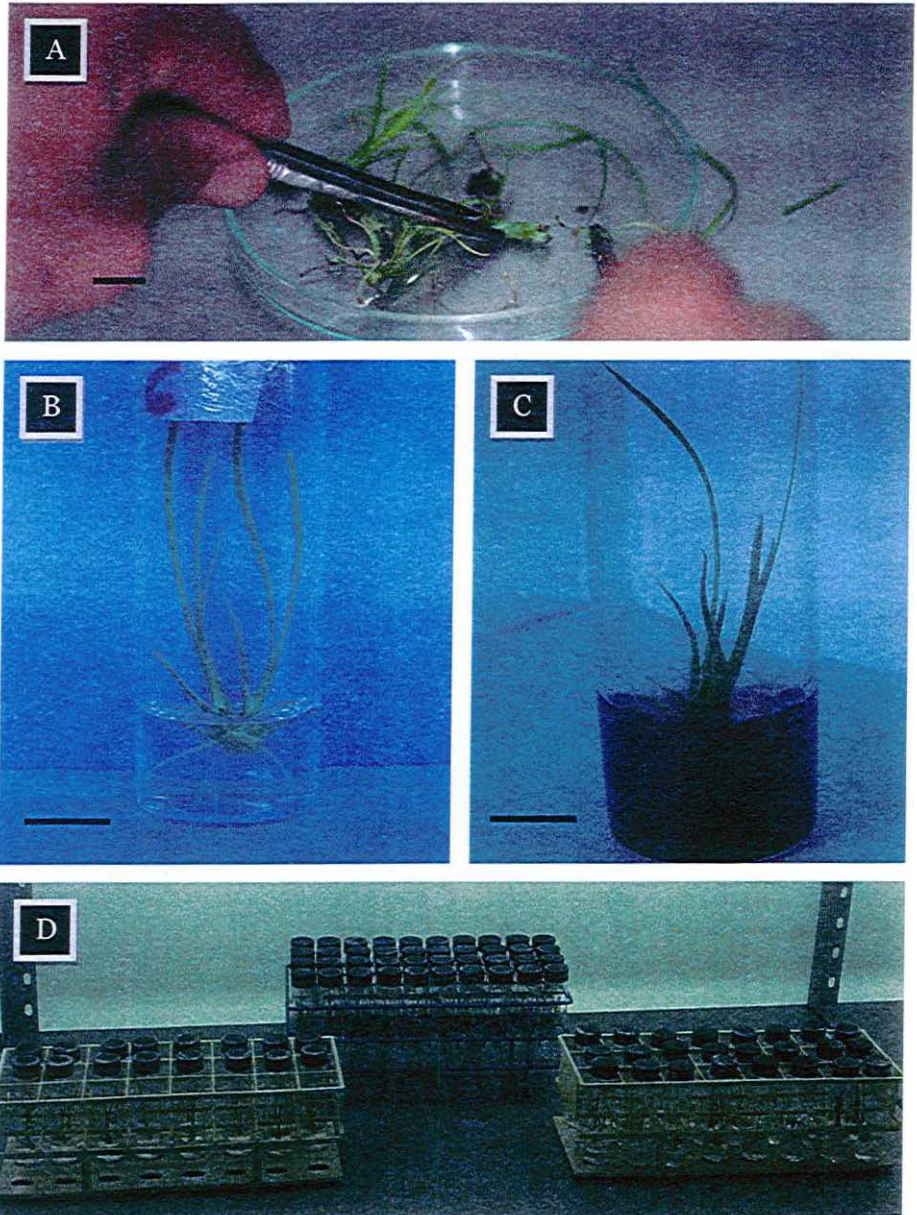


Figura 5. Estimulación para producción de raíz. Barra = 1 cm. A) preparación de los explantes para el cultivo. B) desarrollo de raíz. C) medios de cultivo con carbón activado. D) incubación del material.

7. 4. Aclimatación en el invernadero

Se realizaron evaluaciones cada 15 d, pero, los cambios se comenzaron a observar a partir de los 60 d. Se reportan a los 120 d debido a que el comportamiento fue muy similar para todos los factores entre las fechas de evaluación.

7. 4. 1. Evaluación del factor raíz

Para este factor, a los 120 d fue alta la significancia para el número de hojas en comparación con el inicio de la aclimatación ($p=0.0001$). Cuando las plántulas presentaron raíz se obtuvo un media más alta de 2.47 hojas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Número de hojas para el factor raíz.

Factor	Número promedio de hojas/explantes	Grupos DMS
Con raíz	2.43	a
Sin raíz	1.23	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Para la longitud de la hoja no se encontró significancia, no influye para el crecimiento de las hojas que tengan o no raíces ($p=0.1201$). Se observó un aumento en el grosor del tallo, con alta significancia para el factor raíz ($p=0.0000$). Cuando presentan raíz el grosor de tallo tiene una media de 5.00 mm (Cuadro 9). Es muy importante para que el grosor del tallo aumente, que las plantas tengan raíz, y así cumplir con su función de fijación. A partir de las raíces las plantas absorben agua y nutrientes (Rojas y Rovalo, 1981); lo cual permite que se cumpla el proceso fotosintético, entre ellos adquirir el agua necesaria que almacenan en el tallo. Además es parte fundamental del atractivo comercial de la planta.

Cuadro 9. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Grosor del tallo para el factor raíz.

Factor	Promedio del grosor de tallo	Grupos DMS
Con raíz	5.00 mm	a
Sin raíz	1.60 mm	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

En las plantas con raíz, su aclimatación *ex vitro* fue más fácil (Figura 6A), por lo que es un factor importante a consideración para su desarrollo; como lo señala Castillo (2004), las plantas con raíz están mejor preparadas para el suelo y obtener de él sus nutrientes y agua para su desarrollo.

7. 4. 2 Evaluación del factor sustrato

Este factor a los 120 d demostró alta significancia en el número de hojas ($p=0.0059$), los tratamientos dos (30% de turba 30% EB y 40% de agrolita) y tres (20% de turba 20% EB y 60% de agrolita) son estadísticamente iguales. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Número de la hoja para el factor sustrato.

Tratamiento	Número promedio de hojas	Grupos DMS
2. 30% de turba 30% EB y 40% de agrolita.	2.43	a
3. 20% de turba 20% EB y 60% de agrolita.	1.14	a b
1. 40% de turba 40% EB y 20% de agrolita.	0.01	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

La longitud de hojas presentó alta significancia ($p=0.0000$), los tratamientos dos (30% de turba 30% EB y 40% de agrolita) y tres (20% de turba 20% EB y 60% de agrolita) fueron estadísticamente iguales, el sustrato tres es más recomendable debido a que las plantas tienen las hojas más largas con una media de 27.71 mm (Cuadro 11).

Cuadro 11. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Longitud de la hoja para el factor sustrato.

Tratamiento	Promedio de longitud de hojas	Grupos DMS
3. 20% de tuba 20% EB y 60% de agrolita.	27.71 mm	a
2. 30% de turba 30% EB y 40% de agrolita	14.07 mm	a
1. 40% de turba 40% EB y 20% de agrolita.	-14.69 mm	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Se presentó un aumento en el grosor del tallo con alta significancia ($p=0.0001$). *B. recurvata* habita en suelos con pocos nutrientes y muy drenados, requiere de sustratos que no retengan alta humedad como lo señala Contreras y col. (2008), por lo cual en el sustrato de mediana porosidad se alcanza un diámetro de 5.07 mm de tallo (Cuadro 12).

Cuadro 12. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Grosor del tallo para el factor sustrato.

Tratamiento	Promedio del grosor de tallo	Grupos DMS
2. 30% de turba 30% EB y 40% de agrolita.	5.07 mm	a
3. 20% de turba 20% EB y 60% de agrolita.	3.06 mm	b
1. 40% de turba 40% EB y 20% de agrolita.	1.78 mm	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

7. 4. 3. Evaluación del factor fertilización

A los 120 d el número de hojas para el factor fertilización no presentó significancia ($p=0.2035$). En la longitud de hojas se encontró significancia en el factor fertilizante ($p=0.0308$), son estadísticamente iguales 10 y 0 mL; pero se observa que al utilizar 0 mL de fertilizante se obtiene una media de 20.56 mm (Cuadro 13). Martínez-Ruiz y col. (2005) señalan que las plantas *ex vitro* tienen un mejor desarrollo cuando se fertilizan, en nuestro caso la fertilización no influyó como se esperaba. En el tallo no presentó significancia ($p=0.5761$).

Cuadro 13. Aclimatación de *Beaucarnea recurvata* Lemaire a los 120 d. Longitud de la hoja para el factor fertilización.

Tratamiento	Promedio de longitud hojas	Grupos DMS
0 mL de lixiviado de lombriz	20.56 mm	a
10 mL de lixiviado de lombriz	8.74 mm	a b
5 mL de lixiviado de lombriz	-2.21 mm	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Al observar la respuesta para cada dosis no se presentan resultados consistentes al aplicar o carecer de la fertilización. Es conveniente mencionar que este tipo de plantas no requieren agua en abundancia, por lo que se regaban únicamente cada vez que se fertilizaban, teniendo las cantidades de 5 mL, 10 mL y más de 10 mL de agua para el tratamiento sin lixiviado, la cual presentó el promedio más alto. Se especula que el comportamiento no fue por el fertilizante sino por la cantidad de agua que recibían (Cuadro 13.), sugiriendo evaluar lo anterior en futuros trabajos.

Fue muy notorio el desarrollo de las plantas con y sin raíz (Figura 6A), las plantas respondieron de diferente manera a los sustratos al presentar mayor desarrollo en el sustrato dos (Figura 6B), en comparación con el sustrato tres (Figura 6C). En el establecimiento *ex vitro* las plantas se desarrollaron de manera adecuada por que existió mínimo estrés, debido a que en el invernadero las condiciones de humedad relativa (75-85%) y temperatura (35°C) fueron controladas (Figura 6D). Las raíces al transcurrir 120 d presentaron un buen desarrollo y los ápices radicales tocaron fondo de la charola, se observó que las raíces salían de los orificios de drenaje (Figura 6E y F).

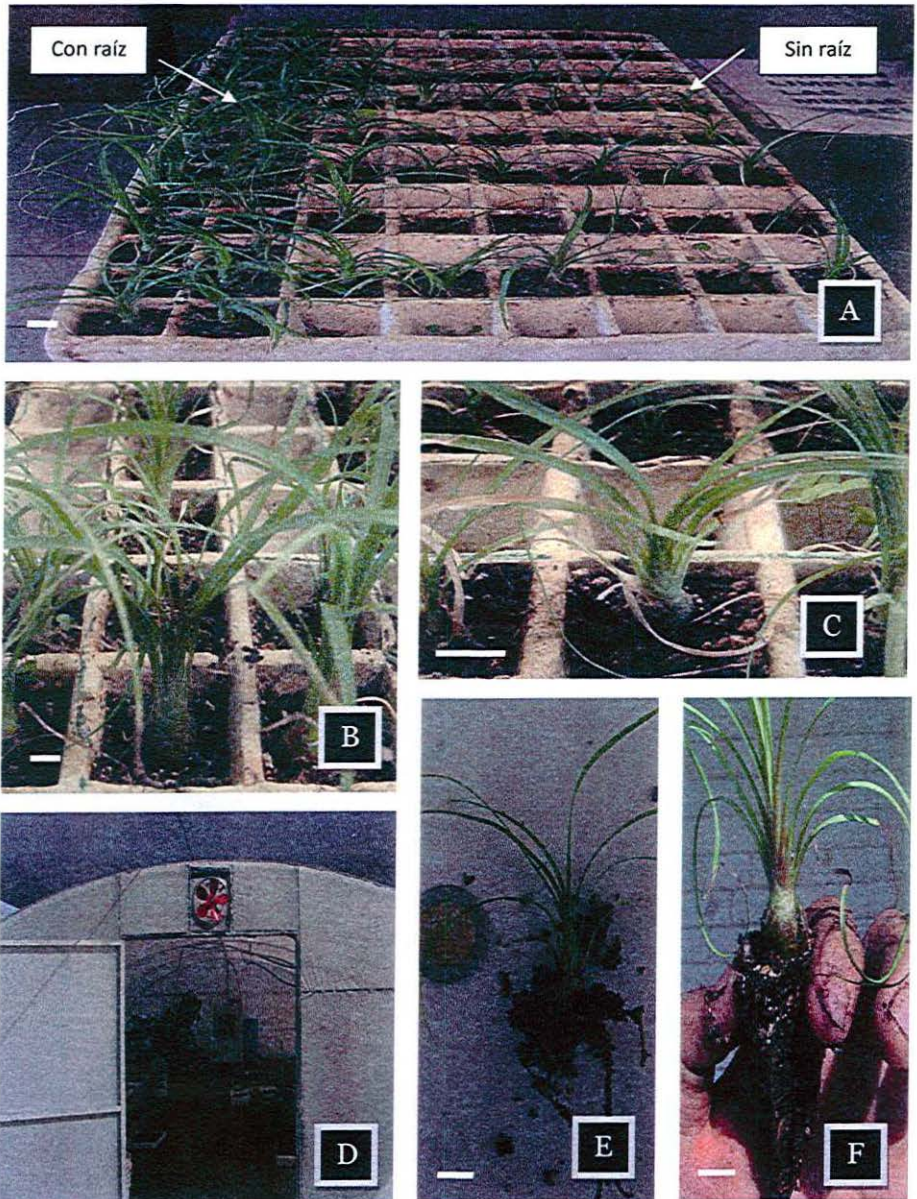


Figura 6. *Beaucarnea recurvata* Lemaire establecidas a condiciones *ex vitro*. Barra = 1 cm. A) plantas con y sin raíz. B) desarrollo en sustrato dos (30% de turba 30% EB y 40% de agrolita). C) desarrollo en sustrato tres (20% de turba 20% EB y 60% de agrolita) D) invernadero. E y F) desarrollo de la raíz a los 120 d.

8. CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *Beaucarnea recurvata*

Se produjeron yemas axilares con 5 mg/L (BA).

El contenedor más viable para la proliferación de yemas axilares fueron los contenedores de plástico de 500 mL utilizando medios de cultivo sólidos, debido a que se produce mayor número de explantes.

Se presentó la estimulación en el desarrollo de la raíz mediante la aplicación de 1mg/L de ácido índol-butírico (AIB), más 2 g/L de Phytigel®

Se aclimataron las plantas con raíz en un sustrato 30% de turba, 30% estiércol de borrego y 40% de agrolita.

9. LITERATURA CITADA

- Bettaieb T., M. Mhamdi e I. Hajlaoui.** 2008. Micropropagation of *Nolina recurvata* Hemsf.: beta-cyclodextrina effects on rooting. *Scientia Horticulturae* 117: 366-368.
- Bordehore C., B. Moya y J. V. Sánchez.** 2008. Árboles y arboledas, monumentales y singulares zacate de Denia <http://www.vivia.es/sdta/pdf/fichas/arboles/26tema13.pdf>. consultada 13 de noviembre de 2008.
- Cardel Y., V. Rico-Gray, J. G. García-Franco y L. B. Thien.** 1997. Ecological status of *Beaucarnea gracilis*, an endemic species of the semiarid Tehuacán Valley, México. *Society for Conservation Biology* 11:367-374.
- Castillo A.** 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf. Consultada 12 de febrero de 2009.
- Colmenares M. y C. Giménez.** 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. Mediante sistema de inmersión temporal. *Faculta de Agronomía de Venezuela* 20: 468-477.
- Contreras A., M. L. Osorio, M. Equihua y G. Benítez.** 2008. Conservación y aprovechamiento de *Beaucarnea recurvata* especie forestal no maderable. *Cuaderno de Biodiversidad*. 28:3-9.
- Cornelis J.** 2004. *Beaucarnea recurvata* cultivar FACH9901BEAU. Registro : U.S. PLT/373 Solicitud Internacional, UPOV-ROM GTITM. Publicada por U.S Patent Documents. <http://www.google.com.mx/patents?id=>. 18 de marzo de 2009.
- Dodds H. J. y L. W. Roberts.** 1985. Experiments in plant tissue culture Second edition. University of Cambridge. University Press. 232 p.

- Espinosa G. A., E. Aguirre, A. Monsalvo y J. E. Campos.** 2006. Estudios de conservación *ex situ* de *Beaucarnea gracilis* del Valle de Zapotitlán, Puebla, a través de pruebas de viabilidad y senescencia experimental. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Guanajuato <http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Carteles/Jueves/Ju027.pdf>. Consultada 18 de marzo de 2009
- Flores-Vindas E.** 1999. La planta; estructura y función. Libro universitario Regional Cartago, Costa Rica. 884 p.
- Fuentes J., A. G. Santiago, L. A. Sánchez y E. Villanueva.** 2006. Efecto de la fuente nitrogenada sobre la organogénesis de *Beaucarnea pliabilis*, una Nolinácea endémica y amenazada. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Guanajuato <http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Carteles/Martes/Ma008.pdf>. Consultada 18 de marzo de 2009.
- García-Mendoza A. y R. Galván.** 1995. Riqueza de las Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 56: 7-24.
- George E. F.** 1993 Plant propagation by tissue culture: The technology. Exegetics Limited. pp. 189-193.
- Gilman E. F. y D. G. Watson.** 1993. *Beaucarnea recurvata* Ponytail. University of Florida, Department of Agriculture. Fact Sheet ST-93. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/ST/ST09300.pdf>. Consultada 19 de marzo de 2009.
- Hartmann H. t., D. E. Kester, F. Davies y R. Geneve.** 2002. Plant Propagation principles and practices. 7a. Edición. 879 p.
- Klug W y M. Cummings.** 1999. Conceptos de genética. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 840 p.
- Martínez-Palacios A., M. Ortega-Larrocea, V. M. Chávez y R. Bye.** 2004. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74: 135-142.

- Martinez-Ruiz R., H. S. Azpiroz-Rivero, J. L. Rodriguez-De la O, V. M. Cetina-Alcala, M. A. Gutierrez-Espinosa.** 2005. Aclimatacion de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalytus urophyllas* T. Blaker y *Eucalytus gradis* Hill ex Maiden. Ra ximhai. 1: 591-597.
- Murashige T. y L. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Osorio R. M. y M. Mata-Rosas.** 2005. Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *Hortscience* 40: 1481-1484.
- Pimienta B. E., A. Muños, B. Ramirez y L. Méndez.** 2006. Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara. 331 p.
- Rojas Garcidueñas M., M. Rovalo Merino** 1979. Fisiología vegetal aplicada. McGRAW-HILL. pp 158-175.
- Soberón J. R., E. N. Quiroga, A. R. Sampietro y M. A Vattuone.** 2005. Citocininas, Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. A.R. Sampietro". Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/reguladores_vegetales_2005/pdfs/citocinas.pdf. Consultada 9 de enero 2009.
- Soler M. y J. M. Soler.** 2004. Mil maderas. Universidad de Valencia, España. pp. 68.
- SEMARNAT,** 2002. Norma Oficial Mexicana.NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. pp. 1-81.
- Torres M. I., M. M. Morales, F. Santacruz-Ruvalcaba y A. Rodriguez.** 2006. Micropropagación por organogénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Universidad de Guadalajara CUCBA. pp. 25-26.

- Villalón, M. L. ReyesCastillo, P. SanchezRamos y G. Sandoval, LH. 1997.
Thrincopyge alacris LeConte (Coleoptera: Buprestidae), borer of the
inflorescences of ponytail palm, *Beaucarnea recurvata* Lem (Nolinaceae)
in Tamaulipas, Mexico. Coleopterists Bulletin 51: 21-21.

BIBLIOTECA CUCL.