

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**EFICIENCIA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE DOS ESPECIES SILVESTRES
DEL GÉNERO *Polianthes* L. (AGAVACEAE), EN RELACIÓN A *Polianthes tuberosa***

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ADANELLY DE LA CRUZ CRUZ

LAS AGUJAS, ZAPOPAN JALISCO., FEBRERO 2013



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-097/2011

C. ADANELLY DE LA CRUZ CRUZ
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 "EFICIENCIA EN LA MICROPAGACION DE DOS ESPECIES SILVESTRES DEL GENERO *Polygonum* L.(AGAVACEAE), EN RELACION A *Polygonum tuberosum*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo, le informamos que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a Ernesto Tapia Campos, Asesor interno a Fernando Santacruz Ruvalcaba y José Manuel Rodríguez Domínguez.

Sin más por el momento, proveeré a usted para enviarle, un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PRENSA Y TRABAJO"

Las Aguas, Tuxtla, Zapotlán Jalisco, 03 de junio de 2011.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIMIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION



M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARÍA DEL COMITÉ DE TITULACION

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de **Tesis e informes**, opción Tesis con el título: **"EFICIENCIA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE DOS ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *Polianthes L. (AGAVACEAE)*, EN RELACIÓN A *Polianthes tuberosa*"** que realizó el/la pasante **Adanelly de la Cruz Cruz** con número de código **301234498** 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., 16 de Enero de 2013



Director
Dr. Ernesto Tapia Campos



Asesor
Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba



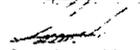
Asesor
Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Nombre completo de los Señores asignados por el Comité de Titulación

Firma de aprobación

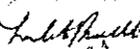
Fecha de aprobación

Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán



16/01/2013

Dr. Liberato Portillo Martínez



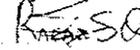
16 de enero 2013

Dr. José Armando Arias García

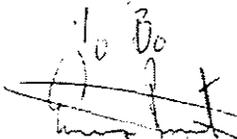


16 de enero 2013

Supl. Dr. Rafael Soltero Quintana



16 DE ENERO 2013



AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Quiero expresar mi agradecimiento al FOMIX Morelos (MOR-2009-C02-120064) por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Dr. Ernesto Tapia Campos, por su dirección en todo el proceso de elaboración de la tesis, por haber confiado en mí, y brindarme la oportunidad de participar en este proyecto también por sus comentarios, paciencia y sus atinadas correcciones, lo que ha sido fundamental para concretar este trabajo, al M. C. José Manuel Rodríguez Domínguez y al Dr. Fernando Santaeruz Ruvalcaba, por su asesoría, consejos, apoyo y el ánimo que me brindaron.

Expreso de igual manera mi gratitud a mis sinodales: Ana Lilia Vigueras Guzmán, Liberato Portillo Martínez, José Armando Arias García y Rafael Soltero Quintana, por su amable aceptación, por formar parte de esta revisión, por el tiempo, las recomendaciones vertidas en esta investigación y valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo de tesis.

A la Universidad de Guadalajara y a todos los profesores que ayudaron en mi formación. Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal por su apoyo para llevar a cabo esta investigación.

DEDICATORIA

A mi madre Luisa Concepción Cruz Bustos como un testimonio de amor y eterno agradecimiento. Porque sin escatimar esfuerzo alguno has estado apoyándome incondicionalmente en todos los aspectos, durante esta y todas las etapas que he vivido, porque siempre has confiado en mí, por tus sabias palabras, ánimos y además por ser mi amiga.

A todos los que directa e indirectamente ayudaron a la realización de este proyecto.

	INDICE	PÁGINA
RESUMEN		1
1. INTRODUCCIÓN		2
2. ANTECEDENTES		4
2.1. Descripción general		4
2.1.1. Descripción por órgano de la planta		4
2.2. Usos de las especies del género <i>Polianthes</i>		7
2.3. Distribución del género <i>Polianthes</i>		7
2.4. Los Recursos genéticos y su conservación		9
2.4.1. Conservación <i>ex situ</i>		10
2.5. Propagación		12
2.6. El cultivo <i>in vitro</i>		13
2.6.1. Las fitohormonas		13
2.7. Sistemas de Micropropagación y regeneración		14
2.7.1. Proliferación de yemas axilares		14
2.7.2. Organogénesis		15
2.7.3. Embriogénesis somática		15
2.8. Conservación <i>in vitro</i>		16
2.9. Propagación <i>in vitro</i> de nardo		17
3. JUSTIFICACIÓN		18
4. HIPÓTESIS		20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución del género *Polianthes* en México (Adaptado de Solano, 2000 y Rocha *et al.*, 2006).
- Figura 2.** Localidades en donde se han recolectado las cinco especies de *Polianthes* (Tomado de Feria-Arroyo *et al.*, 2010).
- Figura 3.** Bulbo de *P. platyphylla* sin capa superficial.
- Figura 4.** Bulbo de *P. howardii* contaminado por hongo.
- Figura 5.** a) Brotes de *P. platyphylla*. b) Brotes de *P. howardii*. c) Brotes de *P. tuberosa* var. Doble
- Figura 6.** Formación de hojas en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.
- Figura 7.** Formación de hojas por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Combinación de reguladores de crecimiento para experimentación.

Cuadro 2. Número de brotes promedio en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.

Cuadro 3. Tamaño promedio de brote por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

Cuadro 4. Tamaño promedio de brote en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.

Cuadro 5. Número promedio de hojas en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.

Cuadro 6. Número promedio de hojas por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

RESUMEN

El género *Polianthes* es de distribución restringida, es sensible a las perturbaciones de su hábitat natural y en consecuencia es vulnerable a la extinción. Varios de los representantes del género son importantes a nivel científico, cultural y económico. La transformación del hábitat es uno de los principales factores que afectan a las poblaciones silvestres tales como *P. platyphylla* y *P. howardii*, que son especies que se encuentran amenazadas, por lo que es necesario tomar medidas para la conservación de las mismas. Una de las estrategias que permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción es el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, con la finalidad de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de estas especies se realizaron varios ensayos para lograr la desinfección del bulbo, encontrando como mejor estrategia de desinfección, un tratamiento fungicida-bactericida a base de Captan® ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Bactrol® ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 20 min y la utilización de cloruro de mercurio (HgCl_2) al 1% durante 10 min. Los bulbos de las distintas especies se colocaron en medio de cultivo MS, en el que fueron evaluados nueve tratamientos a los cuales se les adicionó citoquininas y auxina en diferentes concentraciones donde se evaluaron tres variables de respuesta (a 65 d del cultivo *in vitro*): número de brote, tamaño de brote así como número de hojas. El análisis de datos detectó diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.5$) entre los diferentes tratamientos. Los resultados indican que para la variable número de hoja y tamaño de brote, *P. howardii* logró una mayor eficacia obteniendo hasta dos hojas y un tamaño de brote de 7.53 mm, en cuanto al número de brotes, *P. platyphylla* fue más eficiente utilizando el tratamiento que contenía ANA (Acido naftalenoacético) $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, BA (Benciladenina) $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, KIN (Cinetina) $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1. INTRODUCCIÓN

México tiene una gran diversidad biológica debido a su posición geográfica y sus diferentes climas (Ramamoorthy *et al.*, 1998 y Toledo, 1988). A nivel mundial nuestro país es considerado entre las naciones con mayor riqueza biológica (Villaseñor, 1991), albergando entre el 8 y el 12% de las especies del planeta (Challenger, 1998). Su flora fanerogámica se calcula entre 22.000 (Rzendowzki, 1991) y 22.351 especies (Villaseñor, 2003). Las especies endémicas comprenden el 56% del total de la flora mexicana (Villaseñor, 2003). El género *Polianthes* L. (*Agaviceae*) es endémico de México, e incluye 15 especies, tres variedades y unos pocos cultivares. La mayoría de las especies de este género se utilizan para fines ornamentales y ceremoniales. El más conocido es el taxón *Polianthes tuberosa* L. (Nardo), que ha sido cultivado y utilizado para prácticas medicinales y ceremoniales desde tiempos prehispánicos (Solano y Feria 2007, Solano y Ríos-Gómez, 2011). También es una de las flores de corte más importantes en las zonas tropicales y subtropicales (Benschop, 1993). La flor se mantiene fresca durante un tiempo muy largo, *P. tuberosa* se cultiva comercialmente por sus flores fragantes en países tales como la India, Nueva Zelanda, Japón y México. La mayor parte de la producción en México se concentra en los Estados de México, Morelos y Puebla, en donde existen aproximadamente 300 ha de este cultivo, las cuales generan \$6'300,000 dólares anualmente (Camino *et al.*, 2002). También se cultiva para la industria de la perfumería en la India y Francia.

Por otro lado, las especies silvestres del género presentan coloraciones que van desde el blanco, amarillo, rojizo, rosado y anaranjado, esta característica las hace atractivas para usarlas en programas de mejoramiento genético. Sin embargo, algunas de estas especies están catalogadas como en peligro de extinción, una de las principales razones de este estatus es la pérdida del hábitat natural de estas especies que ha ido desapareciendo por los cambios en el uso del suelo. Por esta situación es necesario generar estrategias que ayuden a la conservación y mantenimiento de estas especies ya sea en su hábitat *in situ* o fuera de éste en colecciones de trabajo o bancos de germoplasma *ex situ*.

Las especies silvestres de *Polianthes* se consideran perennes, el mayor crecimiento vegetativo se presenta durante primavera-verano, florecen durante verano-otoño y permanecen latentes en invierno. La propagación de esta especie puede ser vegetativa mediante el uso de los bulbos que están latentes en el suelo o generativa mediante el uso de

las semillas, la desventaja principal de la propagación por semilla es el tiempo requerido para obtener plantas adultas ya que es muy largo, sin embargo, esta puede ser una gran alternativa en el caso de mantener la diversidad genética y reproducir aquellas especies silvestres del género *Polianthes* que se encuentran en peligro de extinción.

El uso de herramientas biotecnológicas en plantas, en este caso el cultivo *in vitro*, puede ayudar a solucionar los problemas de propagación y conservación de especies vegetales amenazadas, para su posterior uso en el mejoramiento genético.

Cabe mencionar que esta investigación forma parte del proyecto "Mejoramiento genético de Nardo (*Polianthes tuberosa* L.)" cuyo objetivo principal es iniciar un programa de mejoramiento genético del mismo con el propósito de obtener líneas mejoradas útiles para la zona de producción del Estado de Morelos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción general

El género *Polygonatum* pertenece a la familia Agavaceae, hierbas perennes, de raíces carnosas-fibrosas, rizomas cortos y cilíndricos, las bases de las hojas inferiores con aspecto bulboso; hojas basales y caulinares, láminas lineares a lanceoladas, en ocasiones algo suculentas, planas o acañaladas, glabras u ocasionalmente pubescentes, verdes a glaucas, las nervaduras lisas o papilosas en la cara exterior, márgenes hialinos, enteros o finamente denticulados; inflorescencia en forma de espiga o de racimo, con 3 a 8 nudos, por lo general cada nudo con un par de flores, éstas erectas en botón, a la madurez colgantes y con los tubos rectos, recurvados u horizontales, con brácteas florales y 1 ó 2 bractéolas deltoides; flores cilíndrico-tubulosas a angostamente infundibuliformes, algo carnosas a suculentas, de color naranja, rojo, rojo-anaranjado, rosado, blanco o coral, con la garganta amarilla; segmentos del perianto cortos y deltoides o largos y oblongos, ápices ligeramente cuculados y pilosos; estambres inclusos, con inserción en la base de los segmentos o en el tubo, anteras semiversátiles; ovario trilobular, óvulos numerosos, estigma trilobado; cápsula ampliamente elipsoide a globosa, loculicida; semillas deltoides, planas y negras. Alrededor de 15 a 20 especies mexicanas. Se distribuye a través de las zonas montañosas del país. La especie *P. tuberosa* L. es ampliamente cultivada en varias regiones del mundo, en México se conoce como "nardo" (Rzedowski *et al.*, 2005).

2.1.1 Descripción por órgano de la planta

Bulbo y cormo

Las especies del género *Polygonatum* son plantas herbáceas perennes, arrosetadas, cuyas hojas persisten por una sola estación de crecimiento. Presentan un tallo hipogeo transicional que se encuentra cercano a la superficie del suelo, empieza a desarrollarse durante el primer año de crecimiento, carece de raíces, está cubierto con la base de las hojas de la roseta que son casi incoloras cuando están turgentes y al marchitarse adquieren un color café oscuro. Si se eliminan las bases foliares queda al descubierto el tallo y el ápice

del mismo, con algunos remanentes de pedúnculos florales que se formaron en los años anteriores. El arreglo de estos pedúnculos muestra que se originan simpodialmente. Por abajo del tallo anteriormente descrito, inicia su diferenciación durante el segundo año de vida de la planta, un tallo que se dispone en forma vertical, cilíndrico, carnoso, desnudo con entrenudos muy cortos y yemas blanquecinas sin catafilos protectores en los nudos, generalmente es de color café claro, únicamente en *P. howardii* Verhoek es café oscuro. Presenta raíces contráctiles, carnosas de color blanco, su número varía desde dos hasta 22. A partir de las raíces contráctiles se desarrollan raíces secundarias laterales que se caracterizan por ser más delgadas y color café oscuro (excepto *P. densiflora* (Robinson & Fernald) Shinnery). Tanto el bulbo como el cormo del género *Polianthes*, almacenan sustancias de reserva que le permiten sobrevivir durante la época de sequía (Solano, 2000).

Hojas

Las hojas son alternas, dispuestas en forma de roseta y en todas las especies aparecen en su base puntos de color púrpura. Las láminas tienen en general forma lineal, con el ápice agudo. Únicamente en *P. platyphylla* son elíptico lanceoladas a angostamente ovadas, con el ápice mucronado y en *P. howardii* son angostamente oblanceoladas a lineares y también tienen ápice mucronado o agudo. Su longitud va de 8 hasta 50 cm, por 0.2 hasta 2.8 cm de ancho. El número de hojas es muy variable tanto intra como interespecíficamente. El margen puede ser entero o pueden desarrollar papilas o denticillos, también papiloso o finamente denticulado. Solo en *P. graminifolia* es ciliado. Las hojas de todas las especies de *Polianthes* entran en senescencia cuando termina la época de lluvias, vuelven a brotar en la siguiente estación lluviosa, durante este periodo, únicamente permanecen vivos los órganos de almacenamiento (Solano, 2000).

Inflorescencia

El pedúnculo de la inflorescencia es cilíndrico y liso. Aunque en las descripciones originales de la mayoría de las especies de *Polianthes* toda la inflorescencia se designa como escapo, Font Quer (1977) menciona, que un escapo es un tallo que se origina de un

rizoma o bulbo y está desprovisto de hojas, además, porta las flores en el ápice. Aunque esta estructura es común en las monocotiledóneas, en *Polianthes* no corresponde con la definición anterior, en este caso la inflorescencia se origina del ápice de un bulbo, ésta presenta hojas (brácteas) y en la porción fértil brácteas y bractéolas; además, las flores no se disponen en el ápice del eje floral, si no cubren desde la porción media hasta la parte distal del mismo. En la inflorescencia se presenta una bráctea en todas las especies, la cual generalmente se inserta a nivel del nudo floral y rara vez sobre el pedicelo. Las brácteas disminuyen abruptamente de tamaño hacia la porción terminal de la inflorescencia. Las que se encuentran cubriendo las flores pueden ser ovadas o lanceoladas, con ápice agudo o acuminado. El número de nudos fértiles puede ser de uno hasta 41. En general en cada nudo fértil se encuentran dos flores protegidas por una bráctea y una o dos bractéolas.

Únicamente *P. densiflora* y *P. howardii* presentan una sola flor por nudo. Los entrenudos fértiles se van diferenciando del lado opuesto a la bráctea floral, para orientar cada flor o par de flores en una posición pseudolateral (Solano, 2000).

Flor y Fruto

Todas las flores, cuando se encuentran en estadio de yemas, son erectas. Sin embargo a medida que se van diferenciando, cambian de orientación con respecto al eje de la inflorescencia, esta orientación puede variar a medida que las flores maduran. La boca del tubo del perianto puede ser simétrica o asimétrica. Cabe señalar que en el género *Polianthes* no existe una diferenciación entre cáliz y corola, sin embargo se usó el término perianto debido a que en la gran mayoría de los tratamientos taxonómicos de las monocotiledóneas, varios autores lo han venido utilizando. La forma del tubo del perianto puede ser tubular, hipocateriforme e infundiliforme. Los colores de las diferentes especies son muy variados. Los estambres son seis. Los filamentos son blancos o amarillos. Las anteras se localizan en la porción media del tubo o justo por debajo de la boca del mismo, con una longitud de 0.3 a 1.6 cm. El estilo es filiforme a ligeramente engrosado, de color amarillo a blanco y su longitud varía desde 1.0 hasta 10.5 cm. El estigma es trilobado, verde amarillento, amarillo o blanco. El fruto es capsular con dehiscencia loculicida. Puede

ser ampliamente elipsoide a casi esférico. En todas las especies el tubo del perianto permanece seco y completamente curvado hacia la base del fruto (Solano, 2000).

Semillas

La presencia de fitomelano en la exotesta de las semillas es característica del orden Asparagales, por lo tanto está presente en el género *Polianthes*. El fitomelano es un compuesto de los taninos que les confiere color negro el cual puede ser brillante u opaco. Vista de perfil, la forma de la semilla, puede ser deltoides a semicirculares, con un lado recto, prominentemente angulada y rugosa en su cara tangencial (Solano, 2000).

2.2 Usos de las especies del género *Polianthes*

Las especies del género *Polianthes* son utilizadas como planta ornamental en la horticultura, representado principalmente por *P. tuberosa*. Esta flor también se cultiva como fuente de esencia aromática para la industria del perfume. El aceite fragante de *P. tuberosa* proviene principalmente de la India y es uno de los más caros aceites aromáticos que se utilizan en perfumes, con un valor de más de \$2'000,000 de dólares por libra (Hodges, 2010). Algunos de los componentes presentes en el aceite de nardo (principalmente el geraniol, indol y antranilato) se sabe tienen actividad antifúngica (Nidiry y Babu, 2005). Debido a la alta concentración de sapogenina en sus raíces tuberosas, muchas especies se han utilizado como sustituto de jabón (*P. geminiflora*, *P. graminifolia* y *P. tuberosa*). Por este uso dichas especies son conocidas como "amole" nombre náhuatl que significa jabón, o también se les llama omolixochitl u omilixochitl (flor de jabón en lengua náhuatl) (Solano, 2000).

2.3 Distribución del género *Polianthes*

Polianthes tuberosa es originaria de México y se extendió a todo el mundo durante el siglo XVI. Las especies silvestres de este género sólo se encuentran en México y el mayor número de especies se encuentra en el Estado de Jalisco. (Barba-González *et al.*, en

prensa). La distribución geográfica del género *Polianthes*, se encuentra en 18 estados de la República Mexicana. El área que registra la mayor diversidad de especies se localiza en Nueva Galicia, específicamente en el sur de Durango, este de Nayarit, sur de Zacatecas, norte y centro de Jalisco, sur de Aguascalientes y norte de Michoacán. Esta área es el centro de diversidad del género. Según las provincias florísticas propuestas por Rzedowski (1978), todas las especies se encuentran en la región Mesoamericana de Montaña, en las provincias florísticas: Sierra Madre Occidental, Serranías Meridionales (Principalmente en el Eje Neovolcánico Transversal y el sistema Montañoso del Norte de Oaxaca), la depresión del Balsas y la Sierra Madre Oriental (Figura 1). Por lo que se refiere a los tipos de vegetación en los cuales se encuentran las especies, la mayoría de ellas se establecen en bosque de pino, encino o mixtos. Algunas especies habitan los matorrales xerófilos y pastizales, pocas taxa se encuentran en selvas bajas caducifolias o medianas subcaducifolias.

La distribución geográfica y los tipos de vegetación en los cuales se desarrollan las especies que conforman el género *Polianthes* no se habían establecido con precisión. Únicamente se había planteado que es endémico de México con una distribución restringida al centro y oeste de nuestro país. También se menciona que cubre áreas muy reducidas de Chihuahua y se desarrolla preferentemente en clima templado, frecuentemente en bosques de coníferas y pino-encino (Álvarez, 1987; 1989).

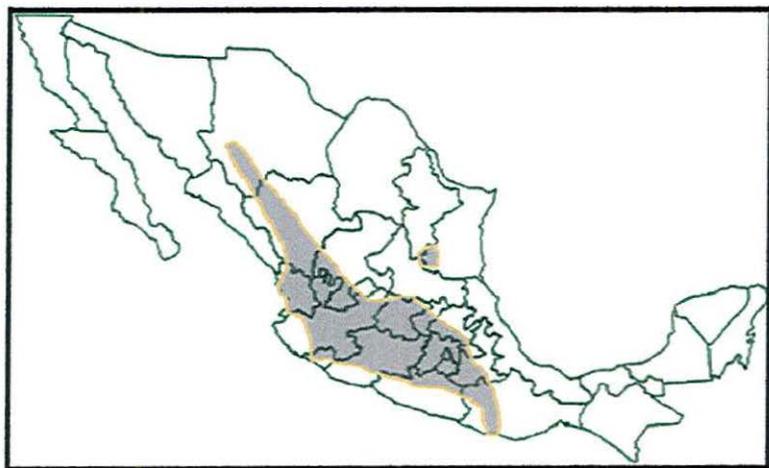


Figura 1. Distribución del género *Polianthes* en México (Adaptado de Solano, 2000 y Rocha *et al.*, 2006).

2.4 Los recursos genéticos y su conservación

Los recursos genéticos son todo material genético de valor real o potencial (Convenio Sobre Diversidad Biológica, 1992). El ser humano depende de los recursos genéticos para su sobrevivencia. El desarrollo de nuevas variedades, la búsqueda de nuevos fitofármacos, la sustitución de colorantes artificiales por pigmentos naturales, la necesidad de encontrar genes de resistencia a diversos factores bióticos y abióticos que afectan a las especies cultivadas y la creciente demanda por nuevas especies ornamentales, son algunos ejemplos que explican el interés mundial por prospectar y coleccionar germoplasma; además, el mismo es conservado y caracterizado desde el punto de vista taxonómico, morfológico, bioquímico, genético y físico químico. Los recursos genéticos son por lo tanto, fuentes actuales y potenciales de negocios que impactan directamente el desarrollo económico de los países, así como el bienestar y la calidad de vida de los ciudadanos. El uso de recursos genéticos vegetales a nivel mundial genera ventas anuales entre 75 y 150 mil millones de dólares en productos farmacéuticos y entre 300 y 450 mil millones de dólares en productos agrícolas (Salazar *et al.*, 2006).

La conservación de los recursos genéticos vegetales (plantas útiles o potencialmente útiles al ser humano), se puede practicar bajo dos modalidades: *in situ*, es decir en el lugar donde crecen en estado silvestre, o *ex situ*, fuera del hábitat natural de los organismos (Salazar *et al.*, 2006).

La conservación *in situ* es la conservación de los ecosistemas y los hábitats naturales el mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies en sus entornos naturales y, en caso de las especies domesticadas y cultivadas, en los entornos que hayan desarrollado sus propiedades específicas (Convenio sobre Diversidad Biológica, 1992)

La protección de los ambientes naturales es el mecanismo más eficiente para conservar la biodiversidad de una región o un país, pues posibilita que ocurran los procesos evolutivos, es decir la adaptación continua de poblaciones silvestres a factores ambientales y promueve el desarrollo de nuevas características genéticas. Sin embargo esta condición es su mayor desventaja, debido a la vulnerabilidad del sistema por su exposición a factores

ambientales y humanos que suelen amenazar la subsistencia de las especies y sus poblaciones, principalmente las especies raras (Salazar *et al.*, 2006).

2.4.1 Conservación *ex situ*

Se define como la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de su hábitat natural o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con apoyo de tecnologías apropiadas para dicho propósito, también ayuda al mantenimiento de poblaciones viables de especies amenazadas sobre todo cuando la amenaza a la supervivencia de las especies es tan severa, que no existe esperanza de su mantenimiento en condiciones *in situ*; proporciona servicios de educación y concienciación pública y permite la investigación básica y aplicada sobre especies y recursos genéticos. Este tipo de conservación estuvo inicialmente orientada a mantener colecciones de variedades de cultivo de gran importancia alimentaria en bancos genéticos; sin embargo, gradualmente se han ido incrementando el número de colecciones de especies silvestres en condiciones de manejo fuera de sus hábitats naturales, lo cual pone en evidencia la importancia de la conservación como parte del manejo de la biodiversidad (Consorcio GTZ/FUNDECO-IE, 2001).

Es sabido que el mecanismo más eficiente para conservar la biodiversidad de la región es proteger sus ambientes naturales, pero es también reconocido que los programas de conservación *ex situ* se justifican para suplementar a los programas de conservación *in situ*, asegurando a largo plazo el análisis y propagación de especies raras y amenazadas. Se debe enfatizar que el propósito del mantenimiento y reproducción en condiciones *ex situ* es reforzar y no reemplazar los mecanismos de conservación de las poblaciones silvestres (Consorcio GTZ/FUNDECO-IE, 2001).

Se define por lo tanto la conservación *ex situ*, como el mantenimiento de los componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales, proceso que implica tanto el almacenamiento de los recursos genéticos en bancos de germoplasma, como el establecimiento de colecciones de campo y manejo de especies en cultivo; para su adecuada práctica se debe tener un amplio conocimiento sobre las especies y, en función de este conocimiento, desarrollar la estrategia adecuada y medidas pertinentes que permitan

recuperar, rehabilitar y reintroducir las especies amenazadas en sus hábitats naturales. Existen múltiples aspectos dentro de una estrategia de conservación en los que se debe tener cuidado: Selección del germoplasma a almacenar a corto, mediano y/o largo plazo, recolección de los recursos biológicos, caracterización y evaluación, procedimientos de conservación y procedimientos para su uso racional con fines de explotación y/o reintroducción en los agroecosistemas o hábitats naturales (Mijangos y Moreno, 2010).

Los mecanismos de conservación *ex situ* deben operar en paralelo a programas y procedimientos adecuados de renovación de germoplasma y programas de mejoramiento que le den utilidad a éste, considerando como parte fundamental la diversidad de las especies involucradas (Mijangos y Moreno, 2010).

México es ubicado por diversos autores entre los países con mayor riqueza florística (Mittermeier y Goettsch, 1992; Neyra y Durand, 1998; Ramamoorthy, *et al.*, 1998; Toledo, 1988). México ocupa el tercer lugar en la diversidad de flora en el mundo, con un total de 22,411 especies (10% de la flora mundial), de las cuales 54.2% son endémicas (Magaña y Villascón, 2002) que habitan principalmente en zonas áridas y semiáridas del país. Según datos del World Conservation Monitoring Centre, mencionado por Walter y Gillett (1998), el 12.5% del total aproximado de 250,000 especies vegetales conocidas en nuestro planeta, se encuentra en peligro de extinción.

La familia Agavaceae se distribuye a lo largo del Continente Americano desde el sur de Canadá, México, Centroamérica, hasta el norte de Sudamérica e islas del Caribe; sin embargo, México es el centro de mayor riqueza y diversidad, ya que en él se encuentra el 75% del total de las especies. Los géneros *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* y *Yucca* pertenecen a la familia Agavaceae. El género *Polianthes*, es de distribución restringida, es sensible a las perturbaciones de su hábitat natural y en consecuencia es vulnerable a la extinción. En México, cinco especies de *Polianthes* (*P. densiflora*, *P. howardii*, *P. longiflora*, *P. palustris* y *P. platyphylla*) se encuentran incluidas en la categoría de protección especial en la Norma Oficial Mexicana (Anónimo, 2002). *P. howardii* está en peligro de extinción y *P. platyphylla* se encuentra amenazada. En estudios realizados por Feria-Arroyo *et al.* (2010), localizaron las áreas donde se distribuyen estas plantas (Figura 2).

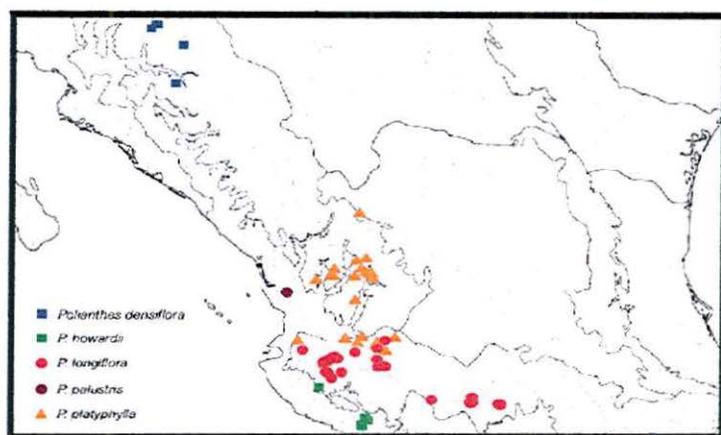


Figura 2. Localidades en donde se han recolectado las cinco especies de *Polianthes* (Tomado de Feria-Arroyo *et al.*, 2010).

2.5 Propagación

Las especies silvestres de *Polianthes* se consideran perennes, su follaje se mantiene una sola temporada de crecimiento y están latentes en invierno. En consecuencia, esta especie puede propagarse de manera vegetativa a través de bulbos o de manera sexual mediante semillas. La principal desventaja de la propagación por semilla es el tiempo necesario para que las plantas alcancen su madurez, sin embargo esto puede ser un medio importante para mantener la diversidad genética y propagación de las especies en peligro de extinción de *Polianthes*. En general las semillas de estas especies permanecen en el suelo durante mucho tiempo y se dispersan en el otoño, perdurando inactivas en el periodo de invierno y listas para germinar en periodo de lluvias en verano. Por tanto estas semillas tienen un largo periodo de viabilidad y se consideran “ortodoxas”.

P. tuberosa se propaga por bulbos, bulbillos y semillas. Al igual que los *Polianthes* silvestres, las plantas procedentes de semillas tardan más tiempo en florecer que las procedentes de bulbos. La producción de semillas es pobre en los tipos de una sola flor y la tasa de germinación es muy baja (Hodges, 2010; Sheela, 2008). Por lo tanto la propagación vegetativa de los bulbos es el método más económico de propagación, utilizándose la propagación por semilla solamente para programas de mejoramiento.

2.6 El Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales puede utilizarse para diversos propósitos tales como: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma. La micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se pueden citar: Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, multiplicación de grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control sanitario del material que se propaga, posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos, etc. (Abdelnour-Esquivel y Vincent-Escalant, 1994). El medio MS (Murashige y Skoog, 1962), inicialmente desarrollado para el cultivo de callos en tabaco, ha probado ser muy exitoso en muchas especies. Presenta concentraciones elevadas de nitrato y de amonio lo que permite su uso en el cultivo de meristemas y estudios de organogénesis. Es probablemente el medio más utilizado en las técnicas de micropropagación.

2.6.1 Las fitohormonas

Las fitohormonas son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o el arreglo particular de su molécula fomentan, inhiben o modifican el desarrollo de los vegetales. Todas las plantas presentan fitohormonas, las cuales son promotoras para el desarrollo y crecimiento, sin embargo éstas pueden ser inhibidas ó reguladas por otras (Pimienta *et al.*, 2006); se encuentran en el meristemo apical, meristemo radicular, en los frutos donde promueven la maduración, así como la abscisión de las hojas y frutos, también actúan en la maduración y desarrollo del embrión. Existen muchos grupos de fitohormonas, de las cuales las más conocidas son las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno. Estas sustancias se utilizan en las diferentes técnicas de micropropagación adicionándose al medio de cultivo donde se conocen como reguladores de crecimiento. En la actualidad las fitohormonas (o reguladores

de crecimiento) son utilizados en diversos campos de la agronomía. Dentro de los reguladores de crecimiento los más importantes son las auxinas, esta palabra proviene del griego *auxein* que significa crecer, es una fitohormona sintetizada en las células del meristemo apical del tallo y ramas, de estas partes es transportada a través de las células de las plantas o por el xilema o floema (Rojas y Rovalo, 1979). Una de sus funciones en las células es promover el ablandamiento de la pared celular (Flores-Vindas, 1999), además 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 caída de frutos (Pimenta *et al.*, 2006).

Las citoquininas son derivados de la 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 así como el letargo en yemas y semillas (Rojas y Rovalo, 1979). El efecto citocinético varía según el compuesto utilizado y el tipo de cultivo. En general es necesario el balance entre auxinas y citoquininas; la interacción es compleja y a veces es necesaria la combinación de dos o más sustancias para obtener el efecto óptimo (Guevara, 1987).

2.7 Sistemas de Micropropagación y regeneración

2.7.1 Proliferación de yemas axilares

El método de proliferación de yemas, es una técnica de micropropagación que utiliza como explante los puntos principales de crecimiento de las plantas, los cuales se encuentran en donde existen meristemos, en tejidos jóvenes y nudos de la planta.

La proliferación de yemas es el método más fácil y rentable de la micropropagación. Generalmente se elige este método porque tiene como ventajas principales ser aplicable a un amplio rango de especies vegetales, proporciona uniformidad de producción y altas tasas de propagación, además de permitir el control de aparición de virus por utilizar partes meristemáticas del tejido como explante inicial (Torres *et al.*, 2006). Según Santaeruz (2002), esta técnica por su manejo se divide en: Cultivo de brotes y cultivo de nudos

2.7.2 Organogénesis

En el método de organogénesis se produce cualquier tipo de órgano como raíz u hoja, pero no una planta completa; 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 *et al.*, 2006). La organogénesis indirecta consiste en que a partir de células no diferenciadas como callo, se presentan brotes, raíces o algún otro órgano, esto ocurre por la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, 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).

2.7.3 Embriogenesis somática

Es la producción de embriones (individuos completos) a partir de una sola célula somática, ocurre de manera natural, esto es debido a la totipotencia de las células vegetales (Hartmann *et al.*, 2002); 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 las hojas de algunas especies (George, 1993). La embriogénesis somática *in vitro* puede también realizarse por las vías directa o indirecta al formar callo. Un tejido se induce a la formación de callo con la presencia de auxinas, estos pueden formar los embriones somáticos o también se pueden desarrollar en cultivos en suspensión. Dicho método presenta variaciones genéticas lo que se denomina variación somaclonal que puede ser una desventaja para algunos cultivos en los que se quiera mantener estables sus características; esta técnica se utiliza para el mejoramiento genético (George, 1993).

2.7 Conservación *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas es una denominación genérica para un conjunto de técnicas que tienen como característica el uso de células, tejidos u órganos como material para propagar el germoplasma, manteniéndolo viable en condiciones asépticas en recipientes que contienen un medio de cultivo sintético, incubado en condiciones medioambientales controladas (Mijangos y Moreno, 2010).

El almacenamiento *in vitro* se puede clasificar, según su duración, en “almacenamiento por corto plazo” (conocido en inglés como “short-term storage”) y en “almacenamiento por largo plazo” (conocido en inglés como “long-term storage”). En el primer tipo, generalmente se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que fomenten el crecimiento reducido, mientras que en el segundo se utiliza principalmente la criopreservación.

En el almacenamiento por corto plazo los explantes permanecen *in vitro* hasta por 12 meses, manejando condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos. Marín y Duran-Vila (1991) conservaron segmentos nodales juveniles enraizados de naranja dulce (*Citrus sinensis*), naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*), lima mexicana (*C. aurantifolia*), toronja (*C. paradisi*) y limón Eureka (*C. limon*) durante un año mediante esta técnica.

Esta estrategia presenta ventajas diferentes a las de las colecciones vivas en campo: Proporciona mayor seguridad al germoplasma en conservación (al tenerlo confinado en instalaciones seguras, en resguardo y vigilancia constantes) ante el efecto de desastres naturales y eventualidades que en campo no pueden ser controladas; mantiene el germoplasma libre de patógenos por medio de su propagación en condiciones asépticas y la limpieza del material biológico de microorganismos por cultivo de meristemas y/o combinación con otros tipos de métodos como la termoterapia; permite un mayor número de accesiones al mantener en recipientes pequeños una gran cantidad de individuos miniaturizados y tejido germinal. Las condiciones de asepsia y tejidos libres de patógenos proporcionan adicionalmente una mayor capacidad de movilidad para el intercambio internacional de germoplasma fiel al tipo, simplificando los procedimientos cuarentenarios (Mijangos y Moreno, 2010).

La conservación estática *ex situ (in vitro)* es complementaria a la conservación *ex situ (in vivo)*, y ambas complementarias a la conservación dinámica *in situ*. La conservación *in vitro* puede ser considerada como una opción con diferentes estrategias: el cultivo *in vitro* bajo condiciones normales de crecimiento para conservación a corto plazo; la conservación en condiciones de lento crecimiento y combinaciones con la criopreservación para estrategias a largo plazo (Mijangos y Moreno, 2010). Pese a las múltiples ventajas que se mencionan de la conservación *in vitro* de especies vegetales, no existe un protocolo universal para la su conservación por esta vía, y es necesario establecer las condiciones más adecuadas de desinfección, establecimiento, propagación y mantenimiento para cada especie.

2.8 Propagación *in vitro* de nardo

La propagación del nardo por medio de cultivo de tejidos ha tenido como objetivo principal el obtener material de siembra libre de virus, así como una multiplicación más rápida, su uso se ha extendido en programas de mejoramiento e investigación en esta especie. En cuanto a la micropropagación masiva Muralidhar y Mehta (1982) lograron la regeneración de hasta 800 plantas a partir de un solo bulbo. Krishnamurthy *et al.* (2001) obtuvieron la micropropagación de dos cultivares de nardo por medio de yemas axilares y secciones del tallo; por otra parte, Hutchinson *et al.* (2004) reportaron el uso de diferentes reguladores de crecimiento como TDZ (Thidiazuron), BA (Benciladamina) y ANA (Ácido Naftalén-1-acético), con el fin de disparar la generación de brotes; además Sangavai y Chellapandi (2008) consiguieron la propagación *in vitro* a partir de segmentos de bulbo. No existen informes científicos sobre cultivo *in vitro* de *Polygonum* silvestres, por lo que será de gran importancia generar la información necesaria respecto a la micropropagación de estas especies para su conservación o reproducción masiva en el caso de que se necesite su reintroducción en los hábitats naturales, así como para el uso potencial de las mismas.

3. JUSTIFICACIÓN

El género *Polianthes* es de distribución restringida, es sensible a las perturbaciones de su hábitat natural y en consecuencia es vulnerable a la extinción. Varios de los representantes del género son importantes a nivel científico, cultural y económico. La transformación del hábitat es uno de los principales factores que afectan a las poblaciones silvestres (García-Mendoza, 1995; 2004). La transformación de los hábitats naturales se debe principalmente a las actividades agrícolas y ganaderas, son precisamente estas modificaciones del hábitat las que ponen en grave peligro a poblaciones de geófitas como las especies de este género, pues sus cormos y bulbos son vulnerables al pisoteo por el ganado y a las labores agrícolas. Estas plantas permanecen vivas durante las estaciones adversas, gracias a sus órganos de reserva subterráneos, entre ellos, cormos, bulbos, tubérculos y rizomas. La parte aérea se seca durante el estiaje y el invierno, pero el vegetal persiste en función de estos órganos, en los cuales se almacenan agua y sustancias nutritivas. El pastoreo, la erosión del suelo y las labores culturales, a menudo destruyen o provocan daños a estas estructuras y colocan a estos organismos en alguna categoría de riesgo (Carter, 1997).

P. platyphylla y *P. howardii*, son especies que se encuentran amenazadas, por lo que es necesario tomar medidas para la conservación de las mismas. Una de las estrategias que permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción es el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Esto se ha demostrado en trabajos de investigación como el realizado con *Agave parrasana* Berger (Santaeruz *et al.*, 1999) en que, gracias a estas técnicas, se logró micropropagar exitosamente esta especie. El género *Polianthes* merece atención especial por ser endémico de México. En el país son pocos los trabajos de micropropagación de plantas y la mayoría de éstos se están desarrollando en especies comestibles (maíz, frijol, trigo). Debido a la mayor rentabilidad de los cultivos ornamentales respecto a cultivos básicos, es importante contar con programas de micropropagación, que evalúen la eficiencia de especies silvestres y comerciales de *Polianthes* para obtener mayor producción de éstas y cubrir las necesidades de este mercado tan demandante y que potencie además especies endémicas que pueden ayudar a proyectar el sector ornamental a nivel internacional. En este sentido, se propone un programa de eficiencia en micropropagación de nardo (especie endémica de

México), evaluando la eficiencia de las concentraciones de diferentes reguladores de crecimiento, también se estará dando uso a los recursos genéticos nacionales así como conservación de germoplasma con la mayor integridad posible de las poblaciones silvestres y comerciales.

4. HIPÓTESIS

Las especies silvestres *Polianthes howardii* y *P. platyphylla* responden eficientemente a los reguladores de crecimiento en condiciones *in vitro* en relación a *P. tuberosa*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar una concentración óptima de reguladores de crecimiento que sea eficiente para la micropropagación de especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *P. tuberosa*.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar diferentes concentraciones de BA (Benciladenina) y ANA (Ácido Naftalenacético), para la micropropagación de *Polianthes platyphylla*, especie amenazada.
- Evaluar diferentes concentraciones de BA (Benciladenina) y ANA (Ácido Naftalenacético), para la micropropagación de *Polianthes howardii*, especie en peligro de extinción.
- Evaluar diferentes concentraciones de BA (Benciladenina) y ANA (Ácido Naftalenacético), para la micropropagación de *Polianthes tuberosa*.

Para la desinfección se realizaron varios ensayos el primero consistió en lavar los bulbos con agua corriente hasta retirar el exceso de tierra, en seguida estos explantes fueron lavados con jabón líquido comercial durante 10 min y se eligió el tratamiento a base de fungicida-bactericida con 0.5 mg·L⁻¹ de Captan® y 0.5 mg·L⁻¹ de Bactrol®, en 500 ml. de agua. donde se sumergieron los explantes. durante 5 min con movimiento constante.

Posteriormente se utilizó una mayor cantidad del fungicida-bactericida (1 mg·L⁻¹) agregándose un tratamiento con shock térmico, el que consistió en colocar los explantes previamente tratados en un vaso de precipitado que contenía agua destilada a una temperatura de 60 °C durante 10 min. a continuación se colocaron los explantes a una temperatura de 4 °C durante 1 h y le siguió el tratamiento de desinfección a base de NaClO (hipoclorito de sodio) al 50% en campana de flujo laminar (Rodríguez, 2011, com. pers.).¹

Para el último ensayo se realizó un lavado con detergente comercial durante 5 min con movimiento constante. A continuación se aplicó un tratamiento fungicida-bactericida, con una solución a base de Captan® (1 mg·L⁻¹) y Bactrol® (1 mg·L⁻¹), los explantes se colocaron en recipientes por separado, dentro de la solución durante 20 min bajo agitación constante. En seguida se pesó 1g de HgCl₂ (Cloruro de mercurio) en 100 ml. de agua destilada estéril.

Se realizó la preparación de juegos de desinfección consistente en colocar 50 ml. de agua destilada en frascos de vidrio, esterilizándose en autoclave durante 15 min. Posteriormente se agregaron 50 ml. de HgCl₂ (Cloruro de mercurio) al 1% en campana de flujo laminar. Cada explante se colocó en un frasco que contenía 50% de agua destilada estéril y 50% de HgCl₂ al 1%, durante 10 min y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, por último se colocó cada explante con ayuda de una pinza (esterilizada y flameada) en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 2 mg·L⁻¹ de ANA, 2 mg·L⁻¹ de BA y 0.5 mg·L⁻¹ de KIN (Muralidhar y Mehta, 1982), el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.1, los frascos se sellaron, rotularon y colocaron en área de incubación a

¹ Rodríguez G. 2011. Dr. del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Jalisco, México.

temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo luz fluorescente ($16\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$), con un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad.

Todos los medios de cultivo, los instrumentos de disección y otros materiales de cristalería fueron esterilizados en un autoclave a una temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de $1.5\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($20\text{ lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$); los medios de cultivo fueron esterilizados durante 15 min y los instrumentos de disección y materiales de cristalería durante 20 min.

6.3 Multiplicación

Para inducir la formación de yemas y promover el desarrollo de yemas axilares, se utilizaron brotes formados en cada explante durante la etapa de establecimiento, en cada frasco se colocaron grupos de tres brotes y se subcultivaron en frascos con medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) al cual se adicionaron $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, se evaluaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento las cuales se presentan en el cuadro 1, de tal manera que se tuvieron nueve tratamientos más un testigo sin reguladores.

Cuadro 1. Combinación de reguladores de crecimiento para producción de brotes

Tratamiento	ANA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	KIN ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
T0	0	0	0
T1	0.25	1.0	0.5
T2	0.25	2.0	0.5
T3	0.25	3.0	0.5
T4	0.50	1.0	0.5
T5	0.50	2.0	0.5
T6	0.50	3.0	0.5
T7	1.00	1.0	0.5
T8	1.00	2.0	0.5
T9	1.00	3.0	0.5

Los frascos se colocaron en un área de incubación a temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo luz fluorescente ($16\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$), con un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. Las variables evaluadas fueron: Número de brotes (NB), tamaño de brote (TB) y número de

hojas (NII). Estas variables fueron evaluadas a 65 d de establecido el experimento, se utilizó un vernier para el caso de las variable tamaño del brote T13.

6.4 Análisis estadístico

El experimento se realizó utilizando un diseño completamente al azar. La unidad experimental consistió en un frasco de cultivo con 1 explante y cada tratamiento constó de cuatro repeticiones (Cuatro frascos). En esta investigación los datos de los diseños experimentales anteriormente mencionados, fueron evaluados utilizando el paquete computacional SAS V8 (Copyright (c) 1999 SAS Institute Inc.) y la comparación de medias de Tukey $\alpha = 0.5$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los ensayos realizados para la desinfección de bulbos en los que solo se utilizó el tratamiento fungicida-bactericida o shock térmico, y no se incluía el uso de $HgCl_2$, presentaron contaminación por hongos y bacterias al tercer día del establecimiento *in vitro* (Figura 4).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Ramos (2012) quien mencionó que al utilizar el tratamiento fungicida-bactericida, se logra la desinfección de plantas de *Figuiera dentata*, aplicándose posteriormente una desinfección con $NaClO$ comercial al 50%.



Figura 4. Bulbo de *P. howardii* contaminado por hongo.

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituye un serio problema a escala mundial. La descontaminación de los explantes obtenidos de las partes subterráneas ha sido una tarea muy difícil, reportado por varios investigadores (Seabrook 1990; Hol y Vander, 1992). Las especies bulbosas presentan en el interior de sus bulbos mucilago y bacterias que dificultan el establecimiento de un cultivo *in vitro* en condiciones asépticas, como lo menciona Chang *et al.* (2003) quienes reportaron este tipo de problemas para hacer una propagación eficiente en *Zantedeschia albomaculata* mediante rizomas de esta especie como fuente de explante, por lo que proponen el uso del meristemas apicales como fuente inicial de explante. Las plantas bulbosas son propagadas a menudo a partir de escamas como en la propagación convencional, esta técnica se ha usado en especies raras y en riesgo

incluyendo algunas plantas endémicas españolas como el narciso *Narcissus* spp. (Fay, 1992). En general la principal fuente de explante para la propagación *in vitro* de *P. tuberosa* ha sido el corno o secciones del mismo, por lo que en el presente experimento fue la fuente de explante que se decidió utilizar.

Martinez (2009), mencionó que durante el establecimiento *in vitro* de yemas del corno de nardo (*Polianthes tuberosa* L.), hongos y bacterias causan la muerte del explante, reportando como agentes causales de la contaminación a *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp.; concluyen que es posible que estos hongos estén localizados dentro de las yemas del corno del bulbo de nardo, lo que dificulta la acción de los desinfectantes superficiales. En el caso de especies silvestres del género *Polianthes* no hay información referente a contaminación por algún patógeno en específico, sin embargo en esta investigación se confirma que la muerte del explante es causado por hongos y bacterias aún no identificadas.

Por carecer de información sobre el manejo *in vitro* del género *Polianthes*, especialmente de las especies silvestres, la estrategia utilizada para la desinfección de los bulbos consistió en varios ensayos hasta encontrar el método más eficiente.

En el presente estudio se encontró que el desinfectante más eficaz para los bulbos de *Polianthes* previamente tratados en solución fungicida-bactericida, fue 50% de agua destilada estéril y 50% de HgCl₂ al 1%, durante 10 min, realizándose tres enjuagues con agua destilada estéril, por lo tanto, esta combinación de desinfección fue la que se aplicó a todo el experimento. Shagufta *et al.* (2012) propusieron el uso de HgCl₂ con una concentración al 0.1% durante 2 a 3 min, para esterilizar bulbos de *P. tuberosa*.

Jiothy *et al.* (2008), también reportan el uso de HgCl₂ 0.1% para esterilizar superficialmente escamas y yemas axilares de dos cultivares de *P. tuberosa*, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) 0.1% por 8 min, encontrando baja contaminación de los explantes pero con diferencias en cuanto al nivel de contaminación entre cultivares.

El uso de HgCl₂, no se ha encontrado eficaz para el establecimiento de cultivos asépticos con un buen porcentaje de supervivencia, debido a que un aumento en tiempo de exposición de este esterilizante llega a matar a los explantes posiblemente a la contaminación por metales del mercurio, lo que resulta fitotóxico para la supervivencia del explante, sin embargo en esta investigación fue positivo su uso.

7.1 Multiplicación

La formación de brotes múltiples es la fase más crucial en la propagación a gran escala de plantas por medio del cultivo de tejidos. La inducción, crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes axilares son, por lo general procesos promovidos por la incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo; comúnmente las citoquininas suprimen la dominancia del meristemo apical y promueven la formación de brotes axilares. Las citoquininas influyen sobre el desarrollo y fisiología de los vegetales, incluyendo germinación de semillas, control de la dominancia apical, interacción planta-patógeno, desarrollo de flores y frutos y senescencia de hojas, entre otros. Estos procesos también son influenciados por otros estímulos como la luz y otros fitorreguladores, y los resultados fisiológicos y de desarrollo reflejan respuestas altamente dependientes de tales estímulos (Shimizu y Mori, 2001; Haberer y Kieber, 2002).

7.2 Variable número de brotes

A 65 d después de establecido el experimento se midieron las diferentes variables. En el caso de la variable (NB) estadísticamente se observó significancia ($p=0.2256$), el promedio por variedad fue diferente. *P. platyphylla* fue la especie que presentó el mayor número de brotes promedio por explante, seguido de los explantes de la especie *P. howardii* y *P. tuberosa*, aunque estos últimos no fueron diferentes estadísticamente (Cuadro 2, Figura 5).

Cuadro 2. Número de brotes promedio en las diferentes especies a 65 d del establecimiento *in vitro*.

Especie de <i>Polianthes</i>	Número promedio de brotes	Grupo
<i>P. platyphylla</i>	3.00	A
<i>P. howardii</i>	1.52	B
<i>P. tuberosa</i> var. Doble	0.95	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

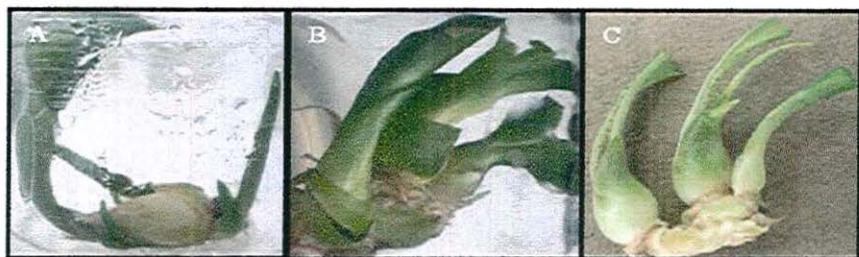


Figura 5. a) Brotes de *P. platyphylla*, b) Brotes de *P. howardii*, c) Brotes de *P. tuberosa* var. Doble.

Jiothy *et al.* (2008) al usar dos diferentes fuentes de explante (escamas y yemas axilares) para la propagación de dos cultivares de *P. tuberosa*, reportan que el mejor explante con base a la producción de brotes, fueron las escamas, al usar el medio basal MS, suplementado con $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de IAA. Datta *et al.* (2002) al utilizar segmentos de hoja de *P. tuberosa* como explante, reportaron que después de cuatro semanas se observó la formación de estructuras nodulares que diferenciaron a brotes y obtuvieron mayor número cuando utilizaron la combinación de reguladores BA a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y GA3 a $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lograron hasta tres brotes en promedio por explante. Según George (1996), una proporción auxina-citocinina balanceada mantiene las células en un estado indiferenciado, mientras que una proporción alta de citocinina en relación auxina promueve el desarrollo de brotes y una proporción baja promueve el desarrollo de raíces.

7.3 Variable tamaño de brote

Transcurridos 65 d del establecimiento de los explantes, se realizó la evaluación de la variable tamaño de brote (TB), encontrándose significancia ($p=0.0001$) en donde los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento que contenía una mayor concentración de citocininas, obteniendo brotes con un tamaño de hasta 12 mm (Cuadro 3). Esta respuesta concuerda con la obtenida por Aurcoles *et al.* (2008), quienes propagaron *Agave inaequidens* Koch, e indican que los tratamientos que tenían concentraciones de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, incrementaron el tamaño de la planta. En cuanto a la especie, la que mostró mejor respuesta fue *P. howardii* alcanzando un tamaño promedio de brote de hasta 7.53 mm (Cuadro 4).

Cuadro 3. Tamaño promedio de brote por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

Tratamientos en mg·L ⁻¹	Tamaño promedio de brote (mm)	Grupo
ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5	12.06	A
Testigo	10.47	B A
ANA 0.25, BA 3.0, KIN	7.47	B A C
ANA 1.0, BA 1.0, KIN	6.60	B A C
ANA 0.25, BA 1.0, KIN 0.5	6.54	B A C
ANA 0.5, BA 2.0, KIN 0.5	4.41	B C
ANA 1.0, BA 2.0, KIN 0.5	3.82	C
ANA 0.25, BA 2.0, KIN 0.5	3.80	C
ANA 0.5, BA 3.0, KIN 0.5	3.14	C
ANA 0.5, BA 1.0, KIN 0.5	2.16	C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Cuadro 4. Tamaño promedio de brote en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.

Especie	Tamaño promedio de brote (mm)	Grupo
<i>P. howardii</i>	7.53	A
<i>P. platyphylla</i>	5.84	B A
<i>P. tuberosa</i> var. Doble	4.76	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

7.4 Variable número de hojas

Los resultados estadísticos para esta variable muestran significancia ($p=0.0502$). *P. tuberosa* var. Doble, fue menos eficiente mientras que *P. howardii* y *P. platyphylla* se comportaron de una manera similar, siendo más eficientes con respecto a esta variable (Cuadro 5, Figura 6). *Polianthes tuberosa* es una especie que presenta gran vigor y alta eficiencia, este cultivar tiene entre 6 y 10 hojas por roseta, mientras que *P. howardii* y *P. platyphylla* tienen entre 2 y 6 hojas por roseta en estado silvestre, sin embargo en estado *in vitro* estos últimos mostraron mayor eficiencia para la variable número de hojas, esto quizá se deba al contenido endógeno de hormonas vegetales y al ser adicionados reguladores de crecimiento al medio de cultivo tiene efectos sinérgicos, los cuales pueden variar en la respuesta de la planta o parte de esta, en la que también están involucrados otros factores

como la edad, condiciones ambientales, estado fisiológico de desarrollo y su estado de nutrición (Rojas y Ramírez, 1987).

Cuadro 5. Número promedio de hojas en las diferentes especies de *Polianthes* a 65 d del cultivo *in vitro*.

Especie	Número promedio de hojas	Grupo
<i>P. howardii</i>	2.31	A
<i>P. platyphylla</i>	2.25	A
<i>P. tuberosa</i> var. Doble	1.08	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de tukey ($\alpha = 0,05$).



Figura 6. Formación de hojas en las diferentes especies a 65 d del cultivo *in vitro*.

Los resultados de este experimento indican que los tratamientos probados incrementaron el número de hojas con el tratamiento que contenía la mayor concentración de reguladores de crecimiento ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5 mg·L⁻¹ propiciando la formación de un promedio de tres hojas por explante (Cuadro 6 y figura 7). Aureoles *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares utilizando una concentración de 3.0 mg·L⁻¹ de BA, para incrementar el tamaño de la planta y el número de hojas de *Agave inaequidens* Koch. Jankiewicz. (2003) mencionó que las citoquininas generan cambios morfológicos en los tejidos cultivados *in vitro*, resultado del estímulo de la actividad mitótica celular, lo que genera brotación, esto podría explicar los resultados obtenidos tomando en cuenta que en este tratamiento se utilizó en mayor concentración este regulador de crecimiento.

oscilan entre 2.0 a 3.0 mg·L⁻¹ y que una concentración por encima de 4.0 mg·L⁻¹, no resulta eficaz para inducir mayor proliferación de brotes. Además de que la combinación de auxina ANA con citocinina BA, demostró promover la diferenciación de las yemas, también favorecer el crecimiento y calidad de brotes múltiples al utilizar esta combinación.

El método convencional de propagación en el caso de plantaciones comerciales como *P. tuberosa* ha sido por bulbos, y los métodos de propagación *in vitro* se han usado principalmente con el propósito de obtener materiales libres de virus o para obtener una rápida multiplicación (Sheela, 2008). No existen reportes de micropropagación de las especies silvestres de este género debido tal vez a la poca difusión de estas especies endémicas de México, con gran potencial ornamental desde tiempos prehispánicos, algunas de éstas aún se pueden encontrar a la venta en mercados locales (Solano, 2000; Feria-Arroyo *et al.*, 2010). En su artículo sobre la reevaluación del riesgo de extinción de cinco especies silvestres del género *Polianthes* (*P. densiflora*, *P. howardii*, *P. longiflora*, *P. palustris*, *P. platyphylla*), Feria-Arroyo *et al.* (2010) mencionaron que estas especies son microendémicas y presentan poblaciones muy reducidas y poca capacidad de dispersión, características que las hacen vulnerables a la extinción. Estos mismos autores sugieran el uso de la conservación *in vitro* de estas especies como una alternativa de conservación *ex situ*, que obviamente debe ir acompañada de otras estrategias tanto *ex situ* como *in situ*.

El uso de técnicas *in vitro* para el rescate de especies en peligro de extinción se ha reportado previamente en trabajos como la propagación de maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), que es una especie amenazada y de interés económico (Aureoles *et al.*, 2008). Avila y Salgado (2006) lograron establecer cultivos *in vitro* a partir de semillas de diferentes especies de la familia Orchidaceae (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *L. autumnalis*, *Oncidium cavendishianum*, y *O. tigrinum*), que son vulnerables debido a la destrucción de sus hábitats y a la extracción a la que has estado sujetas. Pedroza (2009) logró eficazmente y mediante el uso de cultivo *in vitro* el desarrollo vegetativo de los protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq., una orquídea endémica y en vía de extinción. Rodríguez-Garay *et al.* (1996) obtuvieron la regeneración *in vitro* de *Agave victoria-reginae* Moore mediante embriogénesis somática. Estas son algunas investigaciones que se apoyan en herramientas como el cultivo de tejidos para el rescate de diferentes especies.

Cuadro 6. Número promedio de hojas por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

Tratamientos en mg-L ⁻¹	Número promedio de hojas	Grupo
9-ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5	3.07	A
3-ANA 0.25, BA 3.0, KIN 0.5	2.50	B A
0-Testigo	2.30	B A
6-ANA 0.5, BA 3.0, KIN 0.5	1.89	B A
5-ANA 0.5, BA 2.0, KIN 0.5	1.87	B A
2-ANA 0.25, BA 2.0, KIN 0.5	1.86	B A
1-ANA 0.25, BA 1.0, KIN 0.5	1.85	B A
7-ANA 1.0, BA 1.0, KIN 0.5	1.50	B A
8-ANA 1.0, BA 2.0, KIN 0.5	1.31	B A
4-ANA 0.5, BA 1.0, KIN 0.5	0.62	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).



Figura 7. Formación de hojas por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

Entre las diferentes hormonas del crecimiento de plantas estudiadas hasta ahora, la citocinina BA se considera la más importante para la propagación *in vitro* a través de técnicas de cultivo de tejidos, sin embargo en el presente trabajo se demuestra que este compuesto juega un papel importante pero que responde mejor en combinación con auxina (ANA) la cual se encontraba en mayor concentración en tres tratamientos, entre los cuales estuvo el más efectivo. La regeneración de brotes múltiples de diversos explantes de nardo se ha reportado anteriormente en respuesta a la citocinina BA (Shagufta *et al.*, 2012; Sangavai *et al.*, 2008), así como la utilización de KIN (Gajbhiye *et al.*, 2011).

Gajbhiye *et al.* (2011) mencionan que un medio suplementado con diferentes concentraciones de BA y KIN, exhiben mayor respuesta *in vitro*, en concentraciones que

En el presente trabajo se generó el primer reporte de propagación *in vitro* de dos especies del género *Polianthes* que se encuentran en estatus de riesgo (*P. howardii* y *P. platyphylla*), y se comprobó que las técnicas *in vitro* pueden ser de gran utilidad para la conservación *ex situ* de estas especies; dado que su respuesta, aunque fue diferente en cuanto a las variables evaluadas, se observa promisoría, no sólo para la conservación de éstas en un cuarto de cultivo, sino también para la propagación masiva en el caso de requerir material con el propósito de reintroducir las mismas en hábitats naturales protegidos.

8. CONCLUSIONES

- La estrategia de desinfección en la cual se aplicó un tratamiento fungicida-bactericida, a base de Captan® ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Bactrol® ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 20 min y la utilización de cloruro de mercurio (HgCl_2) al 1% durante 10 min, fue eficiente para prevenir la aparición de microorganismos contaminantes, por lo que puede utilizarse en investigaciones posteriores
- Este trabajo demostró que es posible propagar a las especies silvestres del género *Polianthes* (*P. howardii* y *P. platyphylla*), las cuales responden eficientemente en condiciones *in vitro* en relación a *P. tuberosa* var. Doble., para las que no existían antecedentes en este sentido.
- La respuesta a las condiciones *in vitro* fue diferente entre especies de tal forma que en el caso de la variable número de brotes por explante, la mejor respuesta la presentó *P. platyphylla*, mientras que *P. tuberosa* fue la menos eficiente en cuanto a esta variable.
- Respecto a la variable tamaño de brote y número de hojas, se observó la misma respuesta dependiente de la especie en este caso *P. howardii* presentó la mejor respuesta en cuanto a la variable tamaño de brote y al igual que *P. platyphylla* mostró mayor eficiencia para la variable número de hojas, por el contrario *P. tuberosa* no fue eficiente para ninguna de las variables evaluadas.
- El mejor tratamiento para la propagación *in vitro* de las especies del género *Polianthes* que fueron utilizadas en esta investigación, fue $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, $3.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN para todas las variables, el cual contenía una mayor concentración de citocininas.
- Los protocolos desarrollados generaron de uno a tres brotes por explante en promedio, según la especie, estas tasas de propagación se lograron con el

tratamiento 9 el cual tenía dos tipos de citoquininas (Benciladenina y Cinetina) una de ellas en mayor concentración y una auxina (ANA) que resultó más eficiente para las variables de respuesta: tamaño de brote y número promedio de hojas por brote, por lo que se considera la mejor combinación de reguladores de crecimiento para esta investigación, además de confirmar lo ya mencionado por diferentes autores acerca de que la combinación citoenina-auxina, logran un mejor resultado.

- Los métodos desarrollados pueden aplicarse para la generación masiva de especies silvestres del género *Pollianthes*, para su conservación y en consecuencia disminuir las presiones que la sobreexplotación ejerce sobre las poblaciones.

9. LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel A y Vincent-Escalant J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba, Costa Rica pp. 2-3.
- Álvarez A. 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavaceae Endlicher. Tesis. Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Jardín Botánico Nacional. Cuba. 210 p.
- Álvarez A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las agaváceas. *Revista Jardín Botánico Nacional* 10: 25-35.
- Anónimo. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL.-2001. 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. Segunda Sección. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. pp. 1-65.
- Aureoles RF, Rodríguez JL, Legaria JP, Sahagún CJ y Peña MG. 2008. Propagación *in vitro* del "Maguey Bruto" (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada y de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 263-269.
- Ávila D y Salgado G. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pp. 138-149.
- Barba-González R, Rodríguez-Domínguez JM, Castañeda-Saucedo MC, Rodríguez A, Van Tuyt JM y Tapia-Campos E. (In Press) Mexican Geophytes I. The Genus Polianthes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* (ISSN: 1749-0294).
- Benschop M. 1993. Polianthes. In: Hertog A, y Le Nard M (Ed.). The physiology of flower bulbs. *Elsevier*. Amsterdam. pp. 589-602.

- Benjamin Rodríguez-Garay, Antonia Gutiérrez-Mora y Beatriz Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46: 85-87.
- Camino I.M. Castrejón GVR, Figueroa BR, Aldana LI, y Valdes EME. 2002 *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, Mexico. *Florida Entomologist* 85: 392-393.
- Carter S. 1997. Euphorbiaceae. In: Oldfield, S. (comp.) Cactus and succulent plants. Status survey and conservation plan. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom. pp: 23-26.
- Challenger A. 1998. Utilización y Conservación de los Sistemas Terrestres de México. Ed. CONABIO, Instituto de Biología, UNAM y Sierra Madre. 847 p.
- Chang HS, Chakrabarty D, Hahn EJ y Paek KY. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 39: 129-134.
- Consorcio GTZ/FUNDECOTE. 2001. Estrategia regional de biodiversidad para los países del trópico andino. III Taller regional conservación *Ex situ*. La paz Bolivia 129 p.
- Convenio sobre la Diversidad Biológica. 1992. Multilateral Convention on biological diversity. United Nations Treaty Series. Vol 1760. 1-30619. Disponible en <http://www.biodiv.org/convention/articles.asp?lg=1>
- Copyright (c) 1999 SAS Institute Inc., Cary, NC., USA. All rights reserved.
- Datta SK, Pratibha M y Mandal KA. 2002. Direct shoot organogenesis from different explants of chrysanthemum, marigold, and tuberosa. *Israel Journal of Plant Sciences*. 50: 287-291.

- Dodds HJ y Roberts LW. 1985. Experiments in plant tissue culture Second edition. University of Cambridge, University Press. 232 p.
- Fay MF. 1992. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. In: Vitro Cellular and Developmental Biology, 28:1-4.
- Feria-Arroyo TP, Solano E y García-Mendoza A. 2010. Reevaluación del riesgo de extinción de cinco especies del género *Polianthes* L. (Agavaceae). *Acta Botánica Mexicana* 92: 11-28.
- Flores-Vindas E. 1999. La planta: estructura y función. Libro universitario Regional Cartago, Costa Rica. 884 p.
- Font-Quer P. 1997. Diccionario de botánica 6a. reimpresión. Ediciones Labor, Barcelona España. 1244 p.
- Gajbhiye SS, Tripathi MK, Vidya SM, Singh M, Baghel BS y Tiwari S. 2011. Direct shoot organogenesis from cultured stem disc explants of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). *Journal of Agricultural Technology*. 7(3): 695-709.
- García-Mendoza A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. In: Linares E, F Chiang, R Bye y TS. Elias (eds.). Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Instituto de Biología, Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp. 51-75.
- García-Mendoza A. 2004. Agaváceas. In: García-Mendoza, A. J., M. J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Foundation, México, D.F. pp. 159-169.

- George EF. 1993. Plant propagation by tissue culture: The technology. Exegetics Limited, pp. 189-193.
- George E. 1993/1996. Plant propagation by tissue cultura. In practice. Part 2. Exegetics. Easter Press, England. 786 p.
- Guevara E. 1987. En Memoria. II curso de cultivo de tejidos. Editorial CATIE TURRIALBA, Costa Rica. 128 p.
- Haberer G y Kieber JJ. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormona. *Plant Physiol.* 128: 354-362.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies F y Geneve R. 2002. Plant Propagation principles and practices. 7a. Edición. 879 p.
- Hodges L. 2010. Tuberose as a Cut Flower. *The cut Flower.* 22: 55-5.
- Hol GM y Vander P.C.G. 1992. Reduction of contamination in bulb explant cultivar of narcissus by hot water treatment of parent bulbs. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 31: 75-80.
- Hutchinson MJ, Onamu R y Obukosia S. 2004. Effect of thidiazuron, benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. *Journal of Agricultural Science and Technology.* 6: 48-59.
- Jankiewicz I.S. 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Ed. Mundi- Prensa. México, D. F. 487 p.
- Jyothi R, Singh AK y Krishan PS. 2008. Tuberose cultivars propagation. ICAR a science and technology newsletter. 14 (2): 1-2.

- Krishnamurthy KB, Mythili JB y Meenakshi S. 2001. Micropropagation studies in "single" vs. "double" types of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of Applied Horticulture*.3: 82-84.
- Magaña P y Villaseñor J. 2002. La Flora de México. *Ciencias*, México. 66: 24-26.
- Martínez MO. 2009. Control químico *in vitro* de hongos contaminantes de cultivos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Tesis de ingeniería. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 27.
- Marín ML y Durán-Villa. 1991. Conservation of Citrus Germplasm in Vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(4): 740-746.
- Mijangos S y Moreno L. 2010 Los recursos genéticos vegetales in vitro. Una alternativa de conservación. En: Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. pp:402-405.
- Mittermeier RA y Goettsch de MC. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En Sarukhán J, Dirzo R (Comp.) México ante los retos de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp. 63-73.
- Muralidhar CE y Mehta AR. 1982. Clonal propagation of three ornamental plants through tissue culture methods. In Plant Tissue Culture 1982. Proceedings 5th International Congress of plant Tissue Cell Culture. A. Fujiwara. (ed.). pp. 693-694.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.
- Neyra GL y Durand SL. 1998. Biodiversidad. En Loa LE (Coord.) La diversidad biológica de México: estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. DF. pp. 61-102.

- Nidiry ESJ y Babu CSB. 2005. Antifungal Activity of Tuberose Absolute and some of its Constituents. *Phytotherapy Research* 19: 447-449.
- Pedroza JM. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11: 17-32.
- Pimienta BF, Muñoz A, Ramírez B y Méndez J. 2006. Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara. 331 p.
- Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A y Fa J. 1998. Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución. Ed. Instituto de Biología. UNAM. 812 p.
- Ramos RA. 2012. Micropropagación de plantas nativas del estado de Hidalgo con la capacidad de acumular metales contaminantes. Tesis de Maestría. Universidad Politécnica de Pachuca. Pachuca, Hgo. México.
- Rocha M, Good-Ávila S, Molina-Freaner F, Arita TH, Castillo A, Garcia-Mendoza A, Silva-Montellano A, Gaut SB, Souza V y Eguiarte LE. 2006. Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 329-344.
- Rojas GM y Ramírez H. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas: Fisiología-Experimentación. Limusa. México. D. F. 239 p.
- Rojas GM y Rovalo M. 1979. Fisiología vegetal aplicada. McGRAW-HILL J., pp.158-175.
- Rzedowski GC, de J. Rzedowski y colaboradores. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 1249 p.
- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 432 p.

- Rzedowski J. 1991. Diversidad y Orígenes de la Flora Fanerógama de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21.
- Salazar E, León-Lobos P, Rosas M y Muñoz C. 2006. Estado de la conservación ex situ de los recursos fitogenéticos cultivados y silvestres en Chile. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA No. 156. pp.180.
- Sangavai C y Chellapandi P. 2008. *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology*. 4: 98-101.
- Santaacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Pulido H y Rodríguez-Garay B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- Santaacruz RF. 2002. Apuntes de la clase de cultivos de Tejidos Vegetales. Curso 2002B. CUCBA. Universidad de Guadalajara. (ineditos).
- Seabrook JFA. 1990. Narcissus (*Difodils*). In: Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. y Bajaj, V.P.S. (eds). Handbook of plant cell culture Vol. V: Ornamental species. McGraw-Hill Publishing Company. New York. pp. 577-597.
- Shagufta N, Farah A, Saiqa L, kiran S y Amina T. 2012. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 4107-4112.
- Sheela VL. 2008. Flowers for Trade. Horticultural Science Series-10. K.V. Peter ed. New India Publishing Agency. New Delhi, India. 369 p.
- Solano CE. 2000. Sistemática del género *Polianthes* L. (*Agavaceae*). Tesis de doctorado. UNAM. Facultad de Ciencias. México. 291 p.

- Solano E y Fería TP. 2007. Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status. *Biodiversity Conservation* 16: 1885-1900.
- Solano E y Ríos-Gómez R. 2011. *Polianthes zapopanensis* (Agavaceae), una especie nueva de Jalisco, México. *Brittonia*.63: 70-74.
- Shimizu SS y Mory H. 2001. Control of outgrowth and dormancy in axilar buds. *Plant Physiology*. 127: 1403-1413.
- Toledo VM. 1988. La riqueza biológica de México. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. 81: 17-30.
- Torres MI, Morales MM, Santaacruz RF y Rodríguez A. 2006. Micropropagación por organogénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Universidad de Guadalajara CUCBA, pp. 8-9.
- Villaseñor JL. 1991. Las Heliantheae endémicas de México: una guía hacia la conservación. *Acta Botánica*. 15: 29-46.
- Villaseñor JL. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*. 28(5): 160-166.
- Walter KS y Gillett III. 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Center. IUCN - The World Conservation Union, Gland, 862 p.

ANEXO

Reguladores de crecimiento utilizados en el presente trabajo con su nombre en inglés.

BA (6-Benzylaminopurine)

KIN (6-Furfurylaminopurine)

ANA (α -Naphthaleneacetic)