

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Cultivo *in vitro* De *Nolina micrantha* I.M. Johnst. (Asparagaceae): Una Propuesta
para su Propagación y Conservación de la Especie

Por:

LÁZARO MONTEJO PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Cultivo *in vitro* De *Nolina micrantha* I.M. Johnst. (Asparagaceae): Una Propuesta
para su Propagación y Conservación de la Especie

Por:

LÁZARO MONTEJO PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dra. Aida Isabel Leal Robles
Asesor Principal

Dr. Jesús Valdés Reyna
Coasesor

Dr. Juan Antonio Encina Domínguez
Coasesor

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador Interino de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2023

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis, está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



Lázaro Montejo Pérez

DEDICATORIAS

A mi madre Sra. Pascuala Pérez Gutiérrez

Por haberme dado la vida, ayudado en todas las etapas de mi vida para lograr ser lo que soy; al igual por darme sus buenos consejos. Gracias por los sacrificios y esfuerzos que hizo por mí, en darme la oportunidad de estudiar.

A mi padre Sr. Sebastián Montejo Pérez

Por la disciplina inculcada en mi persona, por haberme conducido en buen camino, y ayudado en lograr estudiar una carrera, muchas gracias.

A mis hermanos

Olga Lidia, Ana Rebeca, Diana Yaneth y Britni Yesenia, les agradezco la motivación que me ofrecieron y la confianza que pusieron en mí, en especial a ti hermano Juan Carlos.

A mis abuelos

Felipe & Elena; Guadalupe & Celestino les agradezco por el apoyo y por las buenas lecciones de vida recibidas de ustedes.

A mis tíos y primos

Por el apoyo moral que recibí en ustedes, gracias tíos Isabela, Bárbara, Alfredo, Julia, Román, Esteban y Francisco; y primos Timoteo, Hulda y Salomón.

A mis amigas

Marcela y Celia gracias por bríndame la amistad y el apoyo incondicional en los momentos buenos y difíciles.

Al Pbro. Francisco Balcázar y a su esposa Eulalia Velasco

Gracias hermanos, por el apoyo incondicional brindado en mí.

AGRADECIMIENTO

A Dios

Por darme la oportunidad de existir, por acompañarme en los momentos difíciles, por haberme puesto a buenas personas en mi camino y guiado a lo largo de mi vida y carrera.

A mi “ALMA TERRA MATER”

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme las puertas y brindarme las herramientas necesarias para formarme como profesionista.

A la Dra. Aida Isabel Leal Robles

Por confiar en mí, por su apoyo y enseñanzas que me brindo durante el desarrollo de la investigación, por todas las enseñanzas y conocimientos impartidas en las materias durante la carrera.

Al Dr. Jesús Valdés Reyna

Le doy las gracias por las enseñanzas y conocimientos impartidas, por los consejos para mi vida profesional y por la confianza que ha puesto en mí.

A mis maestros

Agradezco a la maestra Brenda Guadalupe Avendaño Gallegos por el apoyo brindado en los momentos difíciles, así mismo a los maestros que formaron parte en la carrera, quienes me enseñaron y compartieron sus conocimientos, en especial a los maestros: M.C. Griselda Valdés Ramos, M.C. Carlos Alberto García Agustince, Dra. Susana Gómez Martínez y al Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla, quienes considero que fueron los mejores maestros.

A mis compañeros de generación

Gracias compañeros por la compañía a lo largo de la carrera

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURA	10
ÍNDICE DE TABLA.....	11
ÍNDICE DE ANEXOS	11
PRÓLOGO.....	13
RESUMEN	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. JUSTIFICACIÓN	16
III. OBJETIVOS.....	17
IV. HIPÓTESIS	17
V. REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
5.1. Generalidades de la familia <i>Asparagaceae</i>	18
5.1.1. Familia <i>Asparagaceae</i>	18
5.2. Generalidades de la subfamilia <i>Nolinoideae</i>	18
5.2.1. Subfamilia <i>Nolinoideae</i>	18
5.2.2. Historial Taxonómico de las Nolinoideas	19
5.2.3. Morfología de las Nolinoideas	20
5.3. Género <i>Nolina</i> Michx.....	21
5.3.1. Historia del género	21
5.3.2. Riqueza florística	21
5.3.3. Morfología	22
5.4. <i>Nolina micrantha</i> I.M. Johnst.....	23
5.4.1. Etimología	23
5.4.2. Clasificación Taxonómica.....	23

5.4.3.	Morfología	23
5.4.4.	Distribución de <i>Nolina micrantha</i>	24
5.4.5.	Usos	24
5.5.	Conservación de las Nolinoideas en México.....	25
5.5.1.	<i>In situ</i>	26
5.5.2.	<i>Ex situ</i>	26
5.6.	Factores promotores y limitantes en la germinación de las semillas de las Nolinoideas.....	28
5.6.1.	Factores Ambientales o Externos.....	28
5.6.1.1.	Luz.....	28
5.6.1.2.	Temperatura	28
5.6.1.3.	Humedad	29
5.6.2.	Factores Internos.....	29
5.6.2.1.	Cubierta seminal dura.....	29
5.6.2.2.	Embrión inmaduro.....	29
5.6.2.3.	Posmaduración	29
5.6.2.4.	Presencia de inhibidores.....	30
5.7.	Latencia en las semillas	30
5.7.1.	Factores que influyen en la presencia de la latencia	30
5.7.2.	Tipos de latencia	31
5.7.2.1.	Latencia morfológica.....	31
5.7.2.2.	Latencia fisiológica.....	31
5.7.2.3.	Latencia física.....	31
5.7.2.4.	Latencia morfofisiológica	31
5.8.	Cultivo <i>in vitro</i>	32
5.9.	Micropropagación	32
5.9.1.	Procedimiento.....	32
5.9.1.1.	Establecimiento del cultivo aséptico	32

5.9.1.2.	Crecimiento del inoculo.....	33
5.9.1.3.	Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante ...	33
5.9.2.	Factores que Influyen.....	33
5.9.2.1.	Planta que done el explante.....	34
5.9.2.2.	Factores físicos.....	34
5.9.2.3.	Medio de cultivo	34
5.10.	Medios de cultivos	35
5.10.1.	Nomenclatura General	35
5.10.2.	Medio basal	35
5.10.2.1.	Composición mineral	35
5.10.2.2.	Vitaminas	35
5.10.2.3.	Aminoácidos	36
5.10.2.4.	Azúcares	36
5.10.3.	Reguladores de crecimiento.....	37
5.10.3.1.	Auxinas	37
5.10.3.2.	Citocininas	37
5.10.3.3.	Giberelinas.....	37
5.10.4.	Otros compuestos químicos	38
5.11.	Tipos de cultivos	38
5.11.1.	Cultivos diferenciados	38
5.11.1.1.	Embriogénesis somática.....	39
5.11.1.2.	Organogénesis.....	39
5.12.	Antecedentes en micropropagación con las Nolinoideas	40
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1.	Ubicación geográfica del área experimental	41
6.2.	Colecta de material biológico	41
6.3.	Prueba de viabilidad de semillas.....	41
6.4.	Germinación de Semillas	42

6.4.1.	Desinfección de las semillas	42
6.4.2.	Elaboración de Medio Murashige & Skoog (MS) para germinación ..	43
6.4.3.	Esterilización del medio MS	43
6.4.4.	Esterilización de materiales de siembra	44
6.4.5.	Siembra y germinación <i>in vitro</i>	44
6.5.	Multiplicación <i>in vitro</i> (organogénesis directa)	44
6.5.2.	Propagación <i>in vitro</i>	45
6.6.	Rizogénesis	45
6.6.1.	Elaboración de medio Murashige & Skoog (MS) + Ácido Naftalenacético (ANA)	45
6.6.2.	Rizogénesis de plántulas en germinación	46
6.7.	Análisis estadístico.....	46
6.7.1.	Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey	46
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
7.1.	Análisis de viabilidad con tetrazolio y prueba de germinación en semilla de <i>Nolina micrantha</i>	47
7.1.1.	Prueba de viabilidad de semillas	47
7.1.2.	Prueba de germinación <i>in vitro</i>	48
7.3.	Rizogénesis de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	52
7.4.	Aclimatación de las plántulas a partir de germinación <i>in vitro</i>	54
VIII.	CONCLUSIÓN	56
IX.	RECOMENDACIONES	57
	LITERATURA CITADA	58
	ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Representación de a. <i>Beaucarnea</i> , b. <i>Calibanus</i> , c. <i>Nolina</i> y d. <i>Dasyilirion</i> . (Tomado de: Rojas-Piña <i>et al.</i> , 2014)	20
Figura 2. a. Representación de la inflorescencia y morfología floral; b. Estructuras reproductivas: flores estaminadas y flores pistiladas con detalle de segmento del perianto; c. Vistas apicales del gineceo: sección transversal cerca de la base del ovario, sección transversal en la sección media y ápice; d. Gineceo con detalle del estigma; e. Frutos: vistas laterales y apicales, secciones transversales y, semillas: vistas lateral y apical, sección transversal del género <i>Nolina</i> . (Tomado de: Rojas-Piña <i>et al.</i> , 2014).	22
Figura 3. Algunas características morfológicas de <i>Nolina micrantha</i> : a) tallo cespitoso, hojas cóncavas y convexas. b) Inflorescencia violeta paniculada. c) Inflorescencia en maduración. Naturalista, 2023. Descarga 18 de Febrero de 2023.	24
Figura 4. Lavados con detergente Foca, Sorbitán y Peróxido de hidrogeno para la correcta desinfección de las semillas.	43
Figura 5. Se consideró viables a los embriones teñidos obteniendo 23 semillas no teñidas (46 %) y 27 como teñidas (54 %).	47
Figura 6. a) Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey. b) Velocidad de germinación en 30 días con sus respectivas repeticiones; obteniendo la mayor velocidad en la repetición 2 (R2) con un 78% de germinación en 30 días.	48
Figura 7. a) Se obtuvo 5.83 brotes por explante a 4 mg/L^{-1} y de 0.30 brotes por explante a 0.5 mg/L^{-1} de BAP. b) Promedio de brotes en R1= 6.30, R2= 6.20 y R3= 5.00. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey.	51
Figura 8. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey. Para Raíz sin ANA formadas en germinación (Raíces primarias) en Testigo= 3.20, R1= 2.90, R2= 2.70 y R3= 3.40. Para Raíz con ANA	

(raíces secundarias) en Testigo= 0.0, R1= 6.70, R2= 5.50 y R3= 4.90 en promedio de raíces por plántulas.	53
Figura 9. La aclimatación con sustrato peet moss, perlita y vermiculita a una relación (8:1:1) con las condiciones adecuadas, se obtuvo 17 plántulas aclimatadas es decir un 62.96 %.....	54

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Distribución y números de especies de los géneros de las Nolinoideas por estados. (Tomado de: García-Mendoza & Galván, 1995; Hernández-Sandoval, 2019, 2020).....	19
Tabla 2. Especies endémicas distribuidos en México, principalmente en zonas áridas y semiáridas. * <i>Nolina palmeri</i> sinonimia con <i>N. brandegeei</i> . (Tomado de: Hernández-Sandoval, 2019).	21
Tabla 3. Distribución de las Nolinoideas por entidades federativas y dentro de Áreas Naturales Protegidas, de acuerdo a la clasificación de la CONANP (2018). Tomado de: (Golubov et al., 2007).....	27
Tabla 4. Altura máxima y mínima en 30 días, de plántulas obtenidas en la germinación in vitro con las condiciones adecuadas en temperatura, luz, humedad y nutrientes.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de viabilidad con sal de tetrazolio al 1%, obteniendo 27 embriones teñidos con una incubación de 30° C por 1h.....	70
Anexo 2. La germinación in vitro con medio Murashige & Skoog al 100 %, se vio reflejado con el comienzo de la radícula a los 4 días (a), a los 10 días después del establecimiento (b), a los 30 días después del establecimiento (c).....	70

Anexo 3. Desprendimiento de una cubierta testal como signo de latencia, obtenido a partir de la inmersión a peróxido de hidrogeno al 1 % por 1 hora.	71
Anexo 4. Resultados de germinaciones con medio MS al 100%, dividido en 3 repeticiones (1, 2 y 3); con una incubación de 25 ° C por 30 días.	71
Anexo 5. Altura de las plántulas (P1, P2, P3, P4 y P5) en cm a los 30 días después del establecimiento con sus respectivas repeticiones, espacios en blanco no hubo germinación.....	72
Anexo 6. Brotes obtenidos a partir de la adición de BAP al 4 mg/L ⁻¹ , establecidos en 3 repeticiones de un explante por frasco.	73
Anexo 7. Resultados en diferentes experimentos: a) combinación de ANA y BAP con tejido apical de la base caulinar, b) BAP al 0.5 mg/L ⁻¹ con tejido meristemático apical, c) BAP al 0.5 mg/L ⁻¹ y d) al 4 mg/L ⁻¹ de BAP con tejido apical de la base caulinar.	73
Anexo 8. Proceso de formación de brotes a partir de organogénesis directa al añadir BAP al 4.00 mg/L ⁻¹ , a) formación de pequeños brotes sin diferenciar, b) diferenciación de brotes a plántulas.....	74
Anexo 9. Efectos en formación de raíces adventicias con Ácido Naftalenacetico (ANA), obteniendo resultados a los 21-25 días.....	74
Anexo 10. Imágenes representativas de Repetición 1, 2 y 3 de rizogénesis de plántulas obtenidas a partir de germinación in vitro, con medio Murashige & Skoog adicionado con 0.5 mg/L ⁻¹ de Ácido Naftalenacetico (ANA) para formación de raíces adventicias, observando resultados a los 21 días.....	75
Anexo 11. Aclimatación en sustrato peet moss, perlita y vermiculita a una proporción (8:1:1), a) Trasplante 9 de julio de 2021, b) Aclimatación después de un mes 11 de agosto de 2021 y c) Plántulas a un año 10 de julio de 2022	75

PRÓLOGO

Cuando era niño, recuerdo haber leído un libro de biología y visto fotografías de laboratorios y de la oveja Dolly, la oveja que fue clonada a partir de ingeniería genética. En mi mente no tan infantil me preguntaba si algún día podría hacer eso y al mismo tiempo dudaba si llegaría lograr estudiar una carrera enfocada en esos temas. Si bien los tiempos pasaron y esa fotografía de la ingeniería genética me llevó a inclinarme en temas de biología, sobre todo en la naturaleza y la conservación, con esa mentalidad al ingresar a la carrera de Ingeniero en Agrobiología; de buscar estrategias para conservar y propagar la diversidad de especies de plantas de la mano con la biotecnología.

Al llegar el momento de realizar la tesis, decidí buscar temas sobre la conservación las plantas, llegando a mis manos el tema "Cultivo *In Vitro* de *Nolina micrantha* I.M. Johnst: Una Propuesta para su Propagación y Conservación de la especie", donde aplique mis conocimientos de biología, botánica, fisiología vegetal, ecología, entre otros. Al iniciar la tesis decidí entregarme por completo para entregar un trabajo, tal vez sencillo pero bien fundamentado y sobre todo seguir el método científico lo que caracteriza una investigación.

A lo largo de este escrito se puede encontrar información y conocimiento de otros autores sobre el estado de conservación y la taxonomía de las Nolinoideas, sobre todo mis resultados en la propagación de *Nolina micrantha*, como estrategia para su propagación y conservación.

Por otra parte la investigación motivó aún más en mí ese espíritu de seguir buscando y aprendiendo, que inició con esa fotografía que visualicé en mi niñez.

"Uno llega a ser grande por lo que lee y no por lo que escribe"

Jorge Luis Borges (1899 -1986)

RESUMEN

El estudio se realizó con el objetivo de describir un protocolo de cultivo *in vitro* de *Nolina micrantha*, desde la germinación, hasta su aclimatación *ex vitro* y multiplicación de raíces. Las etapas del experimento y sus resultados fueron: 1) Establecimiento aséptico del cultivo; para la certeza de la viabilidad de las semillas se realizó una prueba bioquímica con sal de tetrazolio al 1 % obtenido un 54 % como semillas viables de 50 semillas, para la germinación de semillas se utilizó un medio basal con MS 4.42 g/L⁻¹, 30 g/L⁻¹ de sacarosa y 7 g/L⁻¹ de Agar bacteriológico como gelificante, se realizaron 3 repeticiones de 50 semillas, obteniendo un 63% de germinación difiriendo con la prueba de sal de tetrazolio. 2) Formación de brotes a partir de organogénesis directa: para la inducción de brotes se elaboró un medio MS adicionado con 4 mg/L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), se tomaron explantes de las germinaciones previas, se registraron brotes de 5.83 en promedio por explante. 3) Enraizamiento; se elaboró un medio para promover la formación de raíces en las plantas previamente germinadas *in vitro*. El medio fue MS adicionado con Ácido Naftalenacetico (ANA) a 0.5 mg/L⁻¹, se cultivaron 10 plantas con 3 repeticiones y el resultado fue la formación de un promedio de 5.7 raíces por explante. 4) Aclimatación; 27 plántulas de la tercera repetición se cultivaron en sustrato de peat moss: vermiculita: perlita (8:1:1), aclimatándose 17 plantas a las condiciones *ex vitro*. Se concluye que la técnica de cultivo *in vitro* es viable, con un 63 % de geminación en 30 días, 5.83 brotes por explante en la multiplicación y con un 62.96 % de plantas aclimatadas a condiciones *ex vitro*.

Palabras Clave: Conservación, Germinación, *In vitro*, Multiplicación, Aclimatación, *Nolina micrantha*.

I. INTRODUCCIÓN

Las regiones de zonas áridas y semiáridas del México, son ecosistemas donde se presenta un alto grado de endemismo (Rzedowski, 1978, 1993) como las nolinoideas que son plantas propias de estos paisajes. La subfamilia *Nolinodeae*, integrada por plantas, arborescentes a arbustivas, a veces sarcocaulas, acaules o con tallos subterráneos, que pertenecen a comunidades de Matorral Rosetófilo y Chaparral Montano de climas áridos o templados, pero con adaptaciones similares a las plantas propias de las comunidades alpinas tropicales (Treviño, 2004), cuenta con 55 a 59 especies en cuatro géneros *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyilirion* y *Nolina*, con el 85 % de estas son endémicas y raras para México.

Desde la época prehispánica varias especies de esta subfamilia han sido apreciadas por la utilidad que le dieron los pueblos mexicanos y norteamericanos, para alimentación y extracción de fibras para artesanías. En nuestros días algunas tienen alguna importancia económica por la población local como artesanal, alimenticio y ornamental, lo cual ha provocado la disminución y distribución las especies de esta subfamilia, además de que la mayoría de las nolinoideas presentan alguna latencia en las semillas, lo cual es un inconveniente en la germinación (Pence, 2011) y están sometidas a fuertes restricciones de agua y condiciones extremas (Harper, 1997).

De las especies presentes en México se encuentra *Nolina micrantha* como una especie rara y endémica, con una distribución restringida para Coahuila y Chihuahua en México y Texas en Estados Unidos. *Nolina micrantha* por ser una especie rara, no se le conoce algún uso por la población local, sin embargo, al ser parte de un ecosistema se deben conocer aspectos básicos de su crecimiento y desarrollo.

Por lo anterior, al utilizar la técnica de germinación *in vitro*, *Nolina micrantha* podría, aumentar su población y preservar la especie en los matorrales en los cuales crece tal especie.

II. JUSTIFICACIÓN

Nolina micrantha crece en matorral rosetófilo y tiene distribución restringida, por lo cual se considera una especie rara y endémica. Se desconoce el estado actual de las poblaciones de esta especie, si bien pueden ser útiles para artesanías y ornamental, se deberá realizar planes de manejo para su aprovechamiento.

El interés de este trabajo, fue abordar temas de conservación de *Nolina micrantha* (Familia: *Asparagaceae*, Subfamilia: *Nolinodeae*) considerando que esta especie ha sido poco estudiada. Por esta razón se decidió obtener mayor información acerca de su hábitat, importancia económica, distribución y formas de propagación aplicando técnicas no convencionales.

Además se realizó un protocolo para su propagación, mediante el uso de la biotecnología, en este caso de germinación y la micropropagación; usando la técnica de cultivo *in vitro*, mediante la adición de azúcares, aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento para así tratar de aumentar su población, característico de esta técnica de conservación y propagación.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir el protocolo de propagación *in vitro* de la especie *Nolina micrantha* desde la germinación hasta su aclimatación *ex vitro*.

Objetivos particulares

- Calcular la viabilidad de las semillas de *Nolina micrantha* para su germinación *in vitro*
- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para el desarrollo de plántulas y formación de raíces
- Registrar la micropropagación *in vitro* de *Nolina micrantha* a partir de raíces adventicias.

IV. HIPÓTESIS

- La prueba de viabilidad de las semillas a través de la prueba con sal de tetracolin es un referente para el resultado esperado en el ensayo de germinación.
- El uso de los reguladores de crecimiento como Bencilaminopurina (BAP) promueven la formación de callos en tejidos cultivados *in vitro*.
- La adición del regulador de crecimiento Ácido Naftalenacético (ANA) en los medios de cultivo favorecen la rizogénesis en plántulas obtenidas a partir de la técnica *in vitro*.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Generalidades de la familia *Asparagaceae*

En este capítulo veremos las generalidades de la familia *Asparagaceae* tomando en cuenta las características principales, la subfamilia, el género y principalmente la especie *Nolina micrantha* desde su distribución, usos y conservación.

5.1.1. Familia *Asparagaceae*

De acuerdo con el Angiosperm Phylogeny Group APG III y IV (2009 y 2016) la familia *Asparagaceae* está integrada por 7 subfamilias (*Agavoideae*, *Aphyllanthoideae*, *Asparagoideae*, *Brodiaeoideae*, *Lomandroideae* y *Scilloideae*) dentro de estas se encuentra la subfamilia *Nolinoideae*. Kubitzki & Rudall (1998) y Van Jaarsveld & Egli (2020) describen a esta familia por estar integradas por arbustos o subarbustos con plantas perennes herbáceas a leñosas; hojas en brotes largos y brotes cortos; flores pequeñas, actinomorfas, solitarias o en umbela o racimo.

5.2. Generalidades de la subfamilia *Nolinoideae*

5.2.1. Subfamilia *Nolinoideae*

Las nolinoideas es una subfamilia endémica y propia de Norteamérica y parte de Centroamérica, integrada por cuatro géneros, los cuales son: *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyilirion* y *Nolina* (Bogler, 1994; Hernández-Sandoval, 2020). En México existen entre 55 – 59 especies herbáceas, arbustivas o arborescentes en esta subfamilia (García-Mendoza & Galván, 1995; Hernández-Sandoval, 2019 y 2020), de las 55 especies registradas para México, el 85 % son endémicas (Hernández-Sandoval, 2020).

Tabla 1. Distribución y números de especies de los géneros de las Nolinoideas por estados. (Tomado de: García-Mendoza & Galván, 1995; Hernández-Sandoval, 2019, 2020).

Estado	<i>Beaucarnea</i>	<i>Calibanus</i>	<i>Dasyilirion</i>	<i>Nolina</i>	Total
Aguascalientes			1	1	2
Baja California				5	5
Baja California Sur				1	1
Campeche	1				1
Coahuila			2	2	4
Colima					0
Chiapas	1				1
Chihuahua			7	4	11
Distrito Federal			1	1	2
Durango			5	4	9
Guanajuato		1	1		2
Guerrero	1		1		2
Hidalgo		1	3	1	5
Jalisco			3	1	1
Edo. De México				1	1
Michoacán				1	1
Morelos				0	0
Nayarit				2	2
Nuevo León		1	3	1	5
Oaxaca	6		3	2	11
Puebla	3		2	2	7
Querétaro		1	3	1	5
Quintana Roo	1				1
San Luis Potosí	1	1	8	4	14
Sinaloa					0
Sonora			1	6	7
Tabasco					0
Tamaulipas	1		2	1	4
Tlaxcala			1		1
Veracruz	1		1	1	3
Yucatán	2				2
Zacatecas			2	3	5
Número de Especies en México	12	2	22	23	59

5.2.2. Historial Taxonómico de las Nolinoideas

Las nolinoideas presentan problemas en su clasificación taxonómica, por ser una subfamilia con plantas dioicas, y por la falta de información como estructuras de las

plantas o información de caracteres y hábitat de dicha subfamilia (Hernández-Sandoval, 2019). La subfamilia *Nolinoideae*, fue propuesta por Nakai (1943) como familia *Nolinaceae* y está constituida por los géneros mencionados. Sin embargo, la subfamilia ha sido clasificada dentro de la familia *Liliaceae* (Bentham y Hooker, 1883; Engler, 1888; Standley, 1920; Krause, 1930; McVaugh, 1989), *Agavaceae* ahora subfamilia *Agavoideae* dentro de la familia *Asparagaceae* (Hutchinson, 1934; Cronquist, 1981; Verhoek & Hess, 2002), *Dracaenaceae* (Takhtajan, 1980 y Brummitt, 1992) o *Nolinaceae* (Dahlgren *et al.*, 1985; Hernández-Sandoval y Simpson, 1994; Bogler, 1994; Walker, 2001). Los estudios filogenéticos publicados y con base en evidencias morfológicas y moleculares, también han sido ubicados dentro de la familia *Convallariaceae* (APG I, 1998), *Ruscaceae* (APG II, 2003; Judd *et al.*, 2008; Rojas-Piña *et al.*, 2014) o como subfamilia *Nolinoideae* dentro de *Asparagaceae* (APG III, 2009). Sin embargo, estas propuestas y las evidencias morfológicas y moleculares no son convincentes (García-Mendoza *et al.*, 2012).

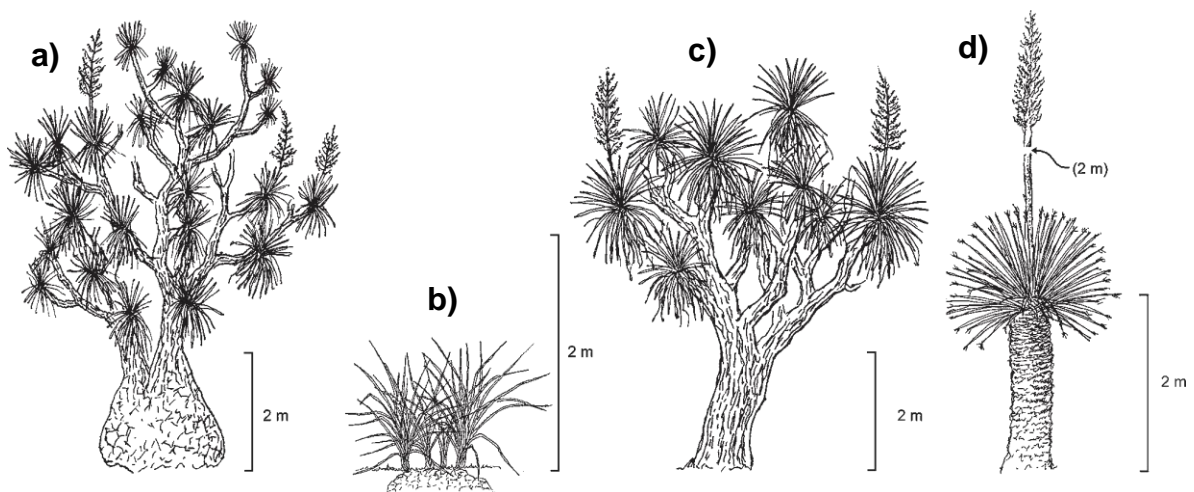


Figura 1. Representación de **a)** *Beaucarnea*, **b)** *Calibanus*, **c)** *Nolina* y **d)** *Dasyllirion*. (Tomado de: Rojas-Piña *et al.*, 2014)

5.2.3. Morfología de las Nolinoideas

Hernández-Sandoval (2020) describe a esta subfamilia por estar integrada por plantas dioicas a polígamo dioicas, arborescentes a arbustivas, a veces sarcocaulas, acaules o con tallos subterráneos, con crecimiento secundario tipo

monocotiledóneo: Hojas agrupadas en rosetas basales o dispuestas al final de las ramas, lineares, con la superficie acanalada. Inflorescencia paniculada a espiciformes (Figura 1).

5.3. Género *Nolina* Michx

5.3.1. Historia del género

El género fue descrito por el botánico francés Andreas Michaux en (1803) en su libro Flora Boreali-Americana, con la descripción de *N. georgiana*. El género *Nolina* no proviene de algún epíteto latino, sino Michaux (1803) dedico este nombre en honor de Abbe P. C. Nolin botánico y Arboricultor de origen francés.

5.3.2. Riqueza florística

El género *Nolina* comprende 30 especies, que se distribuyen del sur de Estados Unidos de América hasta el centro de México; de los cuales 23 se presentan en el territorio nacional, las cuales se muestran en la tabla 2 (Rivera-Lugo & Solano, 2012; Hernández-Sandoval, 2020).

Tabla 2. Especies endémicas distribuidos en México, principalmente en zonas áridas y semiáridas. **Nolina palmeri* sinonimia con *N. brandegeei*. (Tomado de: Hernández-Sandoval, 2019).

Genero <i>Nolina</i> distribuidos en México		
<i>Nolina azureogradiata</i>	<i>Nolina excelsa</i>	<i>Nolina micrantha</i>
<i>Nolina beldingii</i>	<i>Nolina hibernica</i>	<i>Nolina microcarpa</i>
<i>Nolina bigelovii</i>	<i>Nolina humilis</i>	<i>Nolina nelsonii</i>
<i>Nolina cespitifera</i>	<i>Nolina interrata</i>	* <i>N. palmeri</i> (<i>N. brandegeei</i>)
<i>Nolina duranguensis</i>	<i>Nolina juncea</i>	<i>Nolina parviflora</i>
<i>Nolina elegans</i>	<i>Nolina longifolia</i>	<i>Nolina pumila</i>
<i>Nolina erumpens</i>	<i>Nolina matapensis</i>	<i>Nolina texana</i>

5.3.3. Morfología

El género *Nolina* se distingue incluye plantas rosetófilas arborescentes, dioicas o poligamodioicas con las siguientes características: Tallos con frecuencia gruesos y bien desarrollados, otras veces acaules, pero no ensanchados en la base, cubiertos con los restos de las hojas secas o enterradas en suelo. Hojas lineares y cóncavas. Inflorescencias paniculadas o tirsoideas ramas de la inflorescencia generalmente compuestas. Flores generalmente fasciculadas con pedicelos articulados; semillas esféricas a fusiformes, 1 o 2 por fruto, expuestas o no en la madurez, testa lisa o microreticulada, de color marrón claro u oscuro. (Michaux, 1803; Hess, 2002; Rivera-Lugo & Solano, 2012; Hernández-Sandoval, 2020):

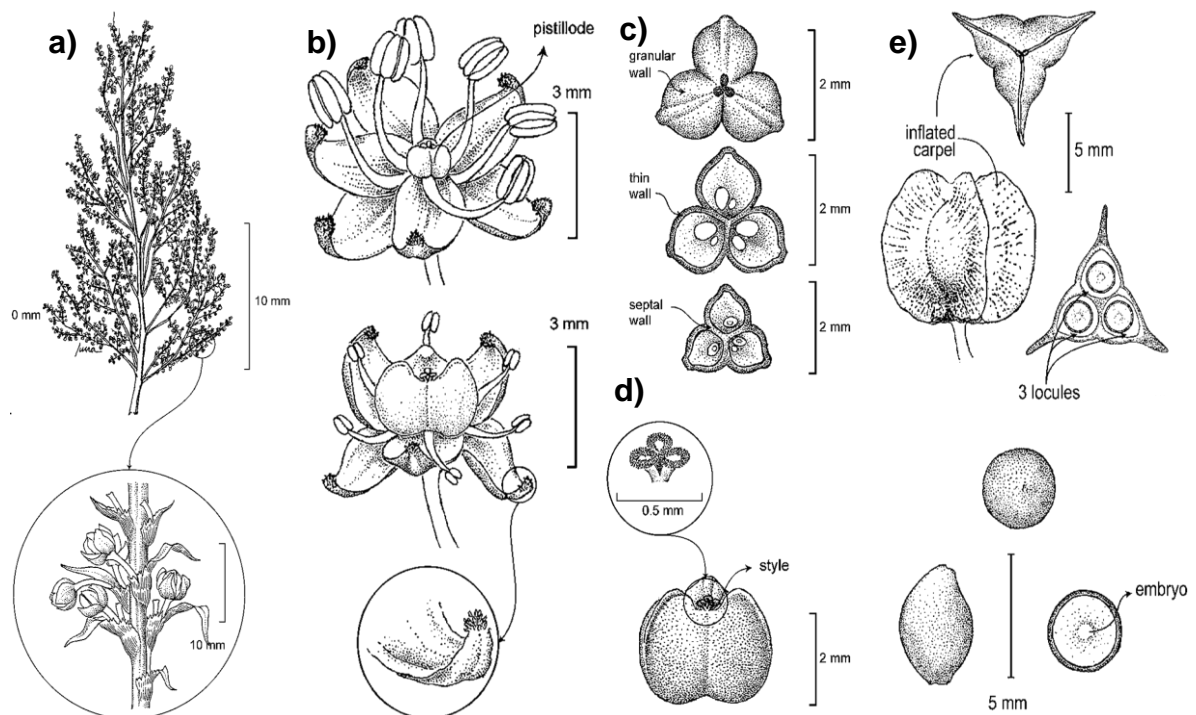


Figura 2. a) Representación de la inflorescencia y morfología floral; b) Estructuras reproductivas: flores estaminadas y flores pistiladas con detalle de segmento del perianto; c) Vistas apicales del gineceo: sección transversal cerca de la base del ovario, sección transversal en la sección media y ápice; d) Gineceo con detalle del estigma; e) Frutos: vistas laterales y apicales, secciones transversales y, semillas: vistas lateral y apical, sección transversal del género *Nolina*. (Tomado de: Rojas-Piña *et al.*, 2014).

5.4. *Nolina micrantha* I.M. Johnst

5.4.1. Etimología

El epíteto específico de *micrantha* proviene del latín que significa “con la flor pequeña”, debido a que sus flores son muy pequeñas, como en casi todas las especies del género *Nolina*.

5.4.2. Clasificación Taxonómica

De acuerdo a Hernández-Sandoval (2019) y la APG III-IV (2009, 2016), proporciona información de la categoría de clasificación de la especie *Nolina micrantha* de la siguiente manera:

Reino: *Metaphyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Liliidae*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Asparagaceae*

Subfamilia: *Nolinoideae*

Género: *Nolina* Michx

Especie: *N. micrantha* I.M. Johnst

Nombres comunes: Palmillo, palmito, Sotolito

5.4.3. Morfología

Johnston (1943), describe a *Nolina micrantha* como una especie, que no presenta tallos, cespitosa, que forma rosetas verticales y ramificadas; las hojas cóncavas y convexas, y duras de 80-130 cm por 4–6 mm de ancho con márgenes cerrados; el escapo de 0.5-2 mm. Inflorescencias paniculadas de color púrpura con medidas de 3.5-7.5 mm por 10.20 cm; frutos en capsulas de paredes firmes; con semillas redondeadas, de 3-5 mm de diámetro.



Figura 3. Algunas características morfológicas de *Nolina micrantha*: **a)** tallo cespitoso, hojas cóncavas y convexas. **b)** Inflorescencia violeta paniculada. **c)** Inflorescencia en maduración. Tomado de: Naturalista, 2023. Descarga 18 de Febrero de 2023.

5.4.4. Distribución de *Nolina micrantha*

Las Nolinoideas son plantas que pertenecen a comunidades de Matorral Rosetófilo y Chaparral Montano de climas áridos o templados, pero con adaptaciones similares a las plantas propias de las comunidades alpinas tropicales (Treviño, 2004). *Nolina micrantha* crece en laderas rocosas de piedra caliza o suelos arenosos y en pastizales; a una altitud de 1200 - 2500 m (Henrickson & Johnston, 2004); florece a finales de primavera, principios de verano, además es similar a *Nolina texana* y *Nolina arenicola* excepto por el pigmento púrpura en la inflorescencia, con épocas de floración tardías y hábito menos robusto (Poole *et al.*, 2007). Se distribuye en la Reserva Natural Estatal Sierra de Zapalinamé, Municipio de Saltillo (A. Cruz, Com. Pers., 18 de noviembre 2020), Parras de la Fuente y Ocampo, Coahuila y el municipio de Chihuahua, Chihuahua, además se encuentra en el estado de Texas, en Estados Unidos (Johnston, 1943); por presentar una distribución restringida, se le considera con especie endémica y rara para el desierto chihuahuense (Henrickson & Johnston, 2004; Poole *et al.*, 2007).

5.4.5. Usos

Es una especie poco abundante en su hábitat, por lo cual no tiene usos por la población local. Algunos estudios, como el de Poinar *et al.* (2001) mencionan que las plantas del género *Nolina* (incluyendo otras familias y géneros), eran parte de la dieta de los nativos norteamericanos hace más de 2000 años. En regiones del norte

de México, los Tarahumaras la utilizan para cestería y en el suroeste de Estados Unidos son utilizados por algunos grupos nómadas y etnias (Bell & Castteter, 1941; Henrickson & Johnston, 2004). Hochstätter (2010) menciona que las más vistosas de este género, son utilizadas como plantas para ornato.

5.5. Conservación de las Nolinoideas en México

Algunas Nolinoideas son plantas propias de los paisajes de las zonas áridas y semiáridas del México, ecosistemas donde se presenta un alto grado de endemismo (Rzedowski, 1978, 1993). Desde la época prehispánica varias especies de esta subfamilia han sido apreciadas por la utilidad que le dieron los pueblos mexicanos y norteamericanos, para alimentación, y extracción de fibras en artesanías. Por lo que han sido afectadas por: 1) destrucción y modificación de sus hábitats causados por las actividades agrícolas, pastoreo urbanización, la explotación forestal y construcción de presas; 2) la extracción selectiva de semillas, plántulas y ejemplares adultos de especies utilizadas como ornamentales (Franco-Martínez, 1995; Golubov *et al.*, 2007). Lo anterior ha ocasionado la reducción e incluso la desaparición de ciertas poblaciones que se ven afectadas por la disminución en la producción de semillas, fenómeno que repercute en el tamaño, estructura poblacional y regeneración natural (Franco-Martínez, 1995). Sin embargo, se carece de información del grado de conservación de *N. micrantha*, en la NOM-059-SEMARNAT-2010, solo se tiene en la lista a 16 especies de la subfamilia *Nolinoideae* en peligro y protegida, de las cuales dos pertenecen al género *Nolina*: *N. cismontana* y *N. interrata* (Semarnat, 2010). Para evitar que la especie en estudio, se incluya en alguna de las categorías de riesgo de la NOM-059-SEMARNAT-2010 y/o por La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se han establecido estrategias para la conservación de las Nolinoideas, agrupadas en dos categorías:

5.5.1. *In situ*

Su objetivo la preservación de las especies en su hábitat y área de distribución natural (Hernández, 1994). Una de ellas son las Áreas Naturales Protegidas (ANPs), dividido en 7 categorías (CONANP, 2018): Reservas de la Biósfera (RB), Parques Nacionales (PN), Áreas de Protección de Flora y Fauna (APFF), Áreas de Protección de Recursos Naturales (APRN), Monumentos Naturales (MN), Santuarios (S), Áreas Destinadas Voluntariamente a la Conservación (ADVC). En la tabla 3 se muestra el número especies del género *Nolina* dentro de las áreas naturales protegidas.

5.5.2. *Ex situ*

Se caracteriza por implementar estrategias de preservación fuera del hábitat natural (Hernández, 1994). Incluyendo a categorías como: **Bancos de Germoplasma**; tienen como finalidad la conservación de colecciones vegetales, así como especímenes completos o partes de ellos fuera de su hábitat natural (Clemente, 1994). **Jardines Botánicos**; unidades destinadas a la conservación y cultivo de plantas para investigación científica en donde sus objetivos se complementan con la investigación, la educación y la difusión (Franco-Martínez, 1995), por ejemplo, el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN así como la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. **Viveros**; representan una alternativa para el aprovechamiento sustentable de la flora silvestre, contribuyendo a disminuir las presiones de colecta selectiva con fines comerciales sobre las poblaciones silvestres (Franco-Martínez, 1995). **In vitro**; herramienta en la obtención y permanencia de plantas mediante la propagación masiva de especies.

Sin embargo, de todas estas alternativas es importante determinar cuáles de estas opciones son las más viables a desarrollar para una especie o un grupo de plantas, tomando en cuenta las características fisiológicas generales de los grupos de plantas (Golubov *et al.*, 2007).

Tabla 3. Distribución de las Nolinoideas por entidades federativas y dentro de Áreas Naturales Protegidas, de acuerdo a la clasificación de la CONANP (2018). Tomado de: (Golubov *et al.*, 2007).

Entidad federativa	Número de especies	Áreas Naturales Protegidas
Oaxaca	11	Tehuacán-Cuicatlán (RB) Lagunas de Chacahua (PN) Huatulco (PN) Benito Juárez (PN) Yagul (MN)
Puebla	7	Tehuacán-Cuicatlán (RB) Iztaccíhuatl-Popocatepetl (PN) La Malinche (PN) Pico de Orizaba (PN)
Durango	9	La Michilia (RB) Mapimí (RB)
Sonora	7	El Pinacate y Gran Desierto de Altar (RB) Alto Golfo de California (RB) Delta del Río Colorado (RB) Sierra de Álamos-Río Cuchujaqui (APFF) Isla San Pedro Mártir (RB)
Jalisco	4	Sierra de Manantlán (RB) La Primavera (APFF) Sierra De Quila (APFF) Chamela-Cuixmala (RB)
Coahuila	4	Maderas Del Carmen (APFF) Mapimí (RB) Cuatrociénegas (APFF) Los Novillos (PN)
Chihuahua	11	Tutuaca (APFF) Cañón de Santa Elena (APFF) Papigochic (APFF) Mapimí (RB) Campo Verde (APFF) Cascada de Bassaseachic (PN) Cumbres de Majalca (PN)
San Luis Potosí	14	Gogorrón (PN) Sierra de Abra Tanchipa (RB) Sierra de Álvarez (APFF) Sierra la Mojonera (APFF) El Potosí (PN)
Nuevo León	5	Cumbres de Monterrey (PN) Cerro de la Silla (MN)
Zacatecas	5	Sierra de Órganos (PN)
Hidalgo	5	Barranca de Metztlán (RB) Los Mármoles (PN) El Chico (PN) Tula (PN)

5.6. Factores promotores y limitantes en la germinación de las semillas de las Nolinoideas

La germinación es un proceso morfogénico que finaliza con la latencia del embrión de una semilla y que dará lugar a una plántula (Angevine & Chabot, 1979). En ambientes áridos y semiáridos este proceso presenta inconvenientes en la germinación, debido a que las semillas están sometidas a fuertes restricciones de agua (Harper, 1997) y condiciones de temperatura extremas. Devlin (1982) menciona los principales mecanismos o factores internos y externos que logran impedir la germinación en las semillas, los cuales se mencionan a continuación:

5.6.1. Factores Ambientales o Externos

Ramón & Mendoza (2002) mencionan algunos de los factores ambientales que impiden que germinen las semillas, los cuales son:

5.6.1.1. Luz

Ocasiona que la germinación presente variaciones, ya que algunas requieren de mayor o menor cantidad para germinar de lo contrario actuaría como inhibidora.

5.6.1.2. Temperatura

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de germinación, ya que influye sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas derivadas del proceso de imbibición. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, con un óptimo intermedio. Por ello, las semillas solo germinan dentro de un cierto margen de temperatura.

5.6.1.3. Humedad

La absorción de agua es el primer paso y el más importante que tiene lugar durante la germinación, esto es para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua a semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea.

5.6.2. Factores Internos

5.6.2.1. Cubierta seminal dura

Es una característica que mantiene el reposo por tres caminos: impide el paso del agua a la semilla, limita tanto el intercambio gaseoso, así como el crecimiento del embrión inmaduro. En la negación del paso de agua en la semilla.

5.6.2.2. Embrión inmaduro

Muchas veces la semilla no llega a germinar por el desarrollo parcial del embrión; pero al formarse completamente comienza su germinación, por lo que la semilla al encontrar un medio favorable tenderá a su desarrollo (Baskin & Baskin, 2004).

5.6.2.3. Posmaduración

En varias especies de plantas las semillas no germinan de inmediato, pero sí después de encontrar condiciones normales, durante este tiempo solo existe una mínima actividad fisiológica.

5.6.2.4. Presencia de inhibidores

Estos pueden encontrarse en las pulpas o frutos de las semillas, cubierta seminal, endospermo, embrión, en estructuras que cubren las semillas. García y Martínez (1994) mencionan que las cubiertas seminales en algunas semillas, imponen una dormición, en la que interfiere con la captación del agua, y las capas de tejidos que rodean al embrión limitan el intercambio gaseoso de este con el exterior; así como la presencia de alguna capa mucilaginosa, lo que dificulta la entrada del oxígeno; la presencia de inhibidores internos o externos en la cubierta como el ácido abscísico y la restricción mecánica a la expansión de la radícula; que en conjunto impiden la germinación.

5.7. Latencia en las semillas

En semillas, la latencia se podría definir como una restricción en germinación bajo las condiciones de temperatura, luz, humedad y ambiente gaseoso que regularmente la promoverían (Simpson, 1990; Footitt *et al.*, 2011)

5.7.1. Factores que influyen en la presencia de la latencia

La latencia en la semilla está determinada por factores genéticos y ambientales (Huang *et al.*, 2015); si bien el ambiente es un indicativo de la presencia de latencia, por ejemplo en ambiente favorable la latencia es ausente (Dayrell *et al.*, 2016), mientras que las especies propias de los ambientes que presentan periodos de congelamiento y de fuertes sequías es más probable de que las semillas presenten algún tipo de latencia (Jurado & Flores, 2005).

5.7.2. Tipos de latencia

La latencia se clasifica como morfológica, fisiológica, física, morfofisiológica o combinada una combinación de latencia endógena y exógena (Baskin & Baskin, 2014).

5.7.2.1. Latencia morfológica

Las semillas que presentan esta latencia tienen los embriones subdesarrollados al momento de la dispersión de las semillas por lo que su desarrollo se termina en el suelo o a la intemperie del ambiente y al estar expuesto a la intemperie del ambiente estas pueden influir en la maduración del embrión.

5.7.2.2. Latencia fisiológica

Las semillas con este tipo de latencia no germinan sino hasta que se presenten las condiciones ambientales requeridas como la temperatura, luz, humedad, concentraciones de gases entre otros.

5.7.2.3. Latencia física

Las semillas con esta latencia presentan una cubierta impermeable que previene la imbibición y por lo consiguiente la germinación. Se desarrolla al final de la maduración de las semillas, cuando comienza el proceso de deshidratación.

5.7.2.4. Latencia morfofisiológica

Combina la morfológica, fisiológica y física, por ejemplo en *Narcissus hispanicus* que presenta tanto latencia física y fisiológica y germina hasta que ambas se rompan.

5.8. Cultivo *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento (Castillo, 2004).

Los usos de las técnicas del cultivo *in vitro* son: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y (d) micropropagación (Villalobos & Thorpe, 1991).

5.9. Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, el cual se realiza a través de la micropropagación de un fragmento de una planta madre llamado explante. Con este procedimiento se obtiene una descendencia uniforme, es decir, plantas genéticamente idénticas, a las cuales se les denominada clones (Quintanilla-Moreno, 2014).

5.9.1. Procedimiento

Murashige (1974) propone tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo.

5.9.1.1. Establecimiento del cultivo aséptico

Después de seleccionar el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán con el explante. Para esta

desinfección se han empleado diferentes compuestos, los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrogeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros.

5.9.1.2. Crecimiento del inoculo

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho, ya conocido, de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación; esta puede ser de tipo epigenético o corresponder a mutaciones verdaderas (Larkin & Scowcroft, 1981).

5.9.1.3. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige & Skoog (1962), por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

5.9.2. Factores que Influyen

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación.

5.9.2.1. Planta que done el explante

El estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye en su capacidad morfogénica. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer & Ghin, 1983).

Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y García, 1982). A este respecto, los meristemos apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (Villalobos & Thorpe, 1991).

5.9.2.2. Factores físicos

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y la noche, y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa (Chee & Pool, 1982).

5.9.2.3. Medio de cultivo

De acuerdo con Gamborg *et al.* (1976) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

5.10. Medios de cultivos

Existen diferentes medios nutritivos para el cultivo de tejidos vegetales que contiene sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento; tales como el de Heller (1953, 1954); Murashige & Skoog (1962); Gamborg (1968, 1970 y 1976); Schenk & Hildebrandt (1972); y el De Fossard (1976). Sin embargo, estos medios nutritivos cambian periódicamente, es decir que no existe una fórmula exacta.

5.10.1. Nomenclatura General

Existen varias fórmulas de sales minerales, como el medio basal; una B mayúscula indica que se trata de sales minerales. Si se utiliza la fórmula de sales minerales de Murashige, se designa como B_{MS}; si se utilizan las sales minerales de White entonces se escribe B_W; las de Shenck & Hildebrandt (1972) se reducen a B_{SH} y así con los demás medios.

5.10.2. Medio basal

5.10.2.1. Composición mineral

Está dada tanto por los macroelementos (C, H, O, N, P, K, S, Mg y Ca) para un crecimiento y una morfogénesis satisfactorios; como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe), en concentraciones adecuadas para el crecimiento celular (Krikorian, 1991; Llorente, 2002; Saad & Elshahed, 2012).

5.10.2.2. Vitaminas

Las vitaminas favorecen al desarrollo de cultivos in vitro y se añaden en la mayoría de medios, son: Acido nicotínico, tiamina (B1) y piridoxina (B6); la tiamina es

necesaria para el crecimiento de todas las células (Ohira *et al.*, 1976). La tiamina se utiliza en concentraciones que oscilan entre 0.1 y 10 mg/L⁻¹. El ácido nicotínico se utiliza en un rango de concentración de 0.1-5 mg/L⁻¹ y la piridoxina se utiliza a 0.1-10 mg/L⁻¹ (Saad & Elshahed, 2012) las vitaminas como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico también son útiles para medios de cultivos, incluyendo al ácido ascórbico que puede ser benéfico en algunos casos (Krikorian, 1991), con estas vitaminas se recomienda que se agreguen a los medios de cultivo solo cuando la concentración de tiamina esté por debajo del nivel deseado (Murashige, 1974).

5.10.2.3. Aminoácidos

Los aminoácidos proporcionan a las células vegetales una fuente de nitrógeno que los tejidos y las células asimilan más rápido que las fuentes de nitrógeno inorgánico (Saad & Elshahed, 2012). Krikorian, 1991 menciona que si los aminoácidos corresponden a la forma D son inhibidores, mientras que en la forma L tienen acción benéfica. Los aminoácidos utilizados para potenciar el crecimiento celular en medios de cultivo, pueden ser; glicina a 2 mg/L⁻¹, glutamina hasta 8 mM, asparagina a 100 mg/L⁻¹, L-arginina y cisteína a 10 mg/L⁻¹ y L-tirosina a 100 mg/L⁻¹ (Torres, 1989).

5.10.2.4. Azúcares

Los azúcares actúan como fuente energética y de carbono; incrementando el potencial osmótico del medio, tales como la sacarosa, una de las más utilizadas en concentraciones del 2 al 4 % (p/v). Otros azúcares como la glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa son capaces mantener el crecimiento, incluso incrementar la producción de metabolitos (Ertola *et al.*, 1994).

5.10.3. Reguladores de crecimiento

El uso de reguladores de crecimiento, como menciona Krikoran (1991) es un “arte”, ya que no existe cantidades exactas para aplicar.

5.10.3.1. Auxinas

Las auxinas pertenecen a una familia de sustancias que tiene la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro* (Krikoran, 1991; Davies, 1995). Las más utilizadas en esta familia son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético).

5.10.3.2. Citocininas

Las citocininas es el promotor que incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994). Entre ellos se encuentran: Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina) que son naturales y, BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina) que son de forma sintética (Llorante, 2002).

5.10.3.3. Giberelinas

Las giberelinas son una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998). Las giberelinas se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes,

promueven la floración y retardan la senescencia. A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las giberelinas, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido (Llorante, 2002).

5.10.4. Otros compuestos químicos

Como las poliaminas ejercen controles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, particularmente en la división celular y en la diferenciación; Los jasmonatos, que comprenden al ácido jasmónico y a su metil éster, inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas. Además, promueven la senescencia, la abscisión y la formación de tubérculos; El ácido salicílico es biosintetizado a partir del aminoácido fenilalanina y su rol fisiológico aún no ha sido determinado. La aplicación exógena induce la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, incrementa la longevidad de las flores, inhibe la síntesis de etileno y la germinación de las semillas; Los brasinoesteroides promueven la elongación del tallo, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz e impulsan la biosíntesis de etileno (Davies, 1995).

5.11. Tipos de cultivos

La producción de plantas puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados. Sin embargo, en esta ocasión solo se tratara de los cultivos diferenciados, ya que es lo que más nos interesa con la propagación de *Nolina micrantha*.

5.11.1. Cultivos diferenciados

Este método de regeneración de plantas por cultivo in vitro incluyen la embriogénesis somática y la organogénesis.

5.11.1.1. Embriogénesis somática

Los embriones somáticos, asexuales o adventicios no resultan de una fusión de gametos. Compuesta por estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz & Jarret, 1991; Jiménez-González, 1998). La embriogénesis somática se puede obtener a partir de células aisladas o utilizando callos. Se utilizan medios con altas concentraciones de sales, de sacarosa o de manitol y se necesita la presencia de una auxina para la iniciación del callo embriogénico, habitualmente 2,4-D. Como la maduración y la germinación de los embriones no ocurren en presencia de esta auxina, se debe remover o usarla en bajas concentraciones para permitir el desarrollo. Además, tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes dependen de la presencia de nitrógeno reducido (Litz & Jarret, 1991).

5.11.1.2. Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraízan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez-González, 1998). La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explante que se quiera cultivar in vitro dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas.

La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991). Los

cultivos diferenciados son más estables genéticamente que los cultivos indiferenciados. A su vez, los cultivos de yemas axilares que provienen de meristemas preexistentes presentan menores índices de variación genética que el cultivo de yemas adventicias que se originan de *novο* a partir de tejidos somáticos con desarrollo directo o indirecto a través de la formación de callos (Paniego, 1995; Rice *et al.*, 1992).

5.12. Antecedentes en micropropagación con las Nolinoideas

Se tiene referencia de algunos estudios en los que realizan cultivo *in vitro* y sus resultados. De esta forma, una investigación de Flores-García *et al.* (2009) reportan la propagación de la especie *Nolina parviflora* a través de organogénesis. Reyes-Silva *et al.* (2013) reportan la propagación de diferentes especies de nolinoideas con tres tipos de citocininas (BA, 2iP, TDZ y MT). Guillén *et al.* (2015) reporta la organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis*. Así mismo diversas tesis como la de Cruz-Cruz (2017) que experimenta con *Dasyllirion cedrosanum* Trel., y la de Nuñez-Coronado (2017) que hace estudios de la morfología, germinación y micropropagación de *Calibanus hookerii* para su conservación. De estos artículos y tesis nos guiaremos para la realización del presente experimento, tomando como referencias sus metodologías y resultados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación geográfica del área experimental

El estudio se realizó en los laboratorios de Biología y Botánica, del Departamento de Botánica de la UAAAN.

6.2. Colecta de material biológico

Las semillas fueron donadas por Protección de la Fauna Mexicana A.C. (Profauna) y colectadas en la Reserva Natural Estatal Sierra de Zapalinamé, a una Latitud: 25.349844 y Longitud: -100.975771 a una altitud de 2500 m, ubicada en el Municipio de Saltillo, Coahuila.

6.3. Prueba de viabilidad de semillas

Se entiende por viabilidad de un lote de semillas, no durmientes, a la capacidad de germinar y de originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables (Pérez-García & Pita-Villamil, 2001). Existen varios métodos para determinar la viabilidad de las semillas entre ellos métodos colorimétricos como el test de tetrazolio que se implementa en una gran variedad de especies, que da evidencia de los procesos de reducción que tienen lugar en células vivas, mediante una sustancia indicadora, internacionalmente se recomienda una solución acuosa al 1% de Cloruro o Bromuro de Tetrazolio, resultando más frecuente e empleo de 2-3-5 Trifenil Cloruro Tetrazolio. Para tener la certeza de que las semillas sean viables para su siembra, se realizó una prueba de viabilidad de embriones. La técnica consistió en contar 50 semillas, colocarlas en una caja petri, añadir agua destilada hasta cubrirlas e incubarlas en el refrigerador a 0° C durante 24 h; transcurrido el tiempo se retiró el agua y se cortaron las semillas quedando expuestos los embriones, seguido del corte, se cubrieron con 20 ml de solución de sal de tetrazolio al 1 % y permanecieron en una cámara de incubación en un rango de temperatura

de 30° C por 1 h; al concluir el tiempo se formaron las semillas y se observaron en el estereoscopio para realizar el grado de tinción y registrar el resultado de viabilidad comparando con la tabla de referencia de Sistema Nacional de Inspección y Certificación Semillas (SNICS, 2018) y de La Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA, 2014)

La viabilidad se expresó en porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left[\frac{\text{Número de semillas viables teñidas de rojo}}{\text{Número total de semillas}} \right] * 100$$

6.4. Germinación de Semillas

De acuerdo a los procedimientos de Murashige (1974) para micropropagar una especie: se empezó con el establecimiento aséptico de las semillas de *Nolina micrantha*; posterior a esto a su subcultivo con regulador de crecimiento.

6.4.1. Desinfección de las semillas

Las semillas se desinfectaron con detergente biodegradable (Foca) durante 3 minutos, seguido de un lavado con Sorbitan (Tween 20) por 5 minutos y por último con una solución de Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) al 1 % durante 1 hora, los cuales presentaron resultados aceptables a desinfección para otros géneros en investigaciones anteriores (Barnett, 1976; Dumroese *et al.*, 1988; Ghildiyal *et al.*, 2007; Wenny y Dumroese, 1987). En cada lavado se consideraron tres enjuagues con agua destilada por 30 segundos. Después de realizar la limpieza previa y ya en el área de cultivo *in vitro* en cámara de flujo laminar, se aplicó otro tratamiento de desinfección, primero con una solución de Hipoclorito de Sodio (Cloralex) 30 ml de agua y 20 ml de cloro por 10 min y enjuagadas con agua destilada esterilizada, y la segunda con una solución de alcohol al 70 % (30 ml de alcohol y 20 ml de agua destilada) por 3 minutos y también enjuagadas con agua destilada esterilizada.

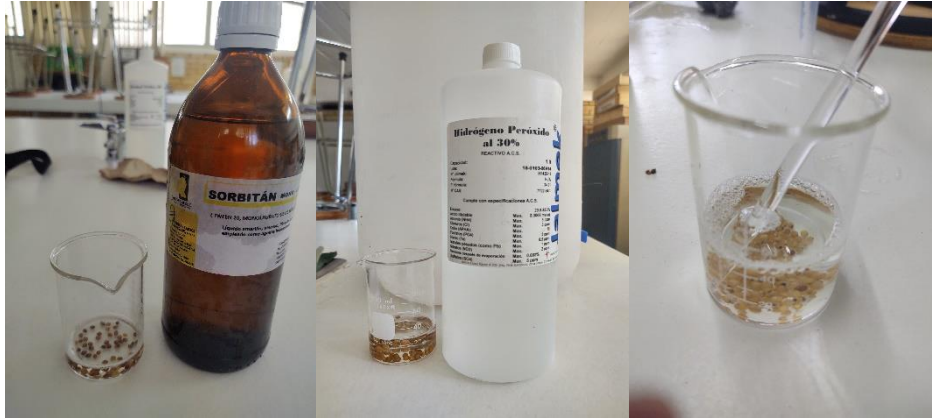


Figura 4. Lavados con detergente Foca, Sorbitán y Peróxido de hidrogeno para la correcta desinfección de las semillas.

6.4.2. Elaboración de Medio Murashige & Skoog (MS) para germinación

Se preparó un medio Murashige & Skoog (MS) al 100 % añadiendo 4.43 g/L^{-1} de medio MS (Plant Media) y 30 g/L^{-1} de Sacarosa (D-sacarosa producto S 391). Pesado en una balanza analítica (A&D/GR-200) y aforado en una probeta. Para un pH óptimo se ajustó con un potenciómetro (Hanna Instruments/HI98107) a una escala 5.6 a 5.8, utilizando NaOH para incrementar o HCl para disminuir el valor del pH. Para obtener el medio gelificado se utilizó 7 g/L^{-1} de agar bacteriológico (Plant Media) y llevado a punto de ebullición en una plancha (Corning PC-320) y agitador magnético a una temperatura de $\pm 200^\circ \text{ C}$. Se vertió el medio a frascos de cristal previamente lavados, esterilizados y tapados.

6.4.3. Esterilización del medio MS

Los frascos se esterilizaron con una autoclave a 120° C - 15 lb/presión por 20 minutos. Previamente lavado la autoclave y agregándole agua destilada a una cantidad considerable. Los frascos se colocaron en bolsas de plástico con cinta indicadora. Después de la esterilización se guardaron en refrigeración.

6.4.4. Esterilización de materiales de siembra

Los materiales de siembra se esterilizaron a en una autoclave a 120° C - 15 lb/presión 20 minutos. Así los matraces con agua destilada, pinzas, cajas petri, sanitas, vasos de precipitado y probetas, se embolsaron y puestos en la autoclave previamente lavado y con agua destilada suficiente; después de la esterilización se dejó enfriar para poder manipularlo.

6.4.5. Siembra y germinación *in vitro*

Para la siembra se utilizaron 50 semillas, para la primera repetición y así con la segunda y tercera repetición; desinfectada con el protocolo antes mencionado. Para la siembra se colocaron 5 semillas en cada frasco, con la ayuda de pinzas estériles, posteriormente se taparon y sellaron con cinta. Se incubaron a temperatura ambiente con una media de $\pm 25^{\circ}$ C, esperando un mes y ver los resultados en germinación.

6.5. Multiplicación *in vitro* (organogénesis directa)

Tomando como referencia de los pasos y resultados obtenidos con Reyes-Silva *et al.* (2013), al utilizar citocininas (BA) a concentraciones de 1, 2, 3 y 4 mg/L⁻¹; siguiendo con el experimento se empleó la concentración de 0.5 mg/L⁻¹ y 4 mg/L⁻¹ para comparar los resultados esperados en la micropropagación en *Nolina micrantha*.

6.5.1. Preparación de medio de cultivo MS adicionado con Bencilaminopurina (BAP)

Se preparó un medio Murashige y Skoog (MS) al 100% añadido 0.5 mg y 5 mg de Bencilaminopurina (BAP) disuelto en agua destilada y aforado. Para un pH óptimo se ajustó con un potenciómetro a una escala 5.6 a 5.8, utilizando NaOH para

incrementar o HCl para disminuir el valor del pH. Como gelificador se utilizó 7 g/L⁻¹ de agar bacteriológico, llevado a ebullición en una plancha magnética a una temperatura de 200° C. Se vertió el medio a frascos de cristal previamente lavados, posterior a esto a su esterilización a 120° C - 15 lb/presión por 15 minutos.

6.5.2. Propagación *in vitro*

En este proceso se tomó explantes de las germinaciones previas realizadas *in vitro*, para tener explantes estériles. El procedimiento fue tomar las plántulas y cortar las raíces y las hojas, y dejar la base apical que contiene el meristemo primario donde se encuentra la parte en crecimiento; la medida de los explantes fue de 0.5 mm a 1 cm, estos se llevaron al medio gelificado y sembrando en condiciones de asepsia un explante por frasco, en 3 repeticiones de 10 frascos. Se esperó la formación de brotes para ambas concentraciones.

6.6. Rizogénesis

6.6.1. Elaboración de medio Murashige & Skoog (MS) + Ácido Naftalenacético (ANA)

Para la preparación del medio MS+ANA se utilizó 0.5 mg/L⁻¹ de Ácido Naftalenacético, 4.43 g/L⁻¹ de medio Murashige & Skoog, 30 g/L⁻¹ de Sacarosa disuelto en agua destilada y aforado. Para un pH óptimo se ajustó con un potenciómetro a una escala 5.6 a 5.8, utilizando NaOH para incrementar o HCl para disminuir el valor del pH. Para obtener el medio sólido se utilizó 7 g/L⁻¹ de agar bacteriológico, llevado a ebullición en una plancha magnética a una temperatura de 200° Celsius. Se vertió el medio a frascos de cristal previamente lavados, esterilizados y tapados.

6.6.2. Rizogénesis de plántulas en germinación

Después de 30 días las plántulas se trasplantaron a un nuevo medio con regulador ANA, este proceso se realizó todo en asepsia; colocando 2 plantas en cada frasco, 5 frascos y total 10 plantas. Se esperaron 30 días para registrar la formación de nuevas raíces (sin considerar las que ya había formado previamente la plántula).

6.7. Análisis estadístico

6.7.1. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA), con el programa estadístico InfoStat 2020, entre la prueba de viabilidad y las 3 repeticiones de germinación, así como con la rizogénesis, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Al detectar efecto en cada experimento, se realizó la comparación de las medias para conocer la significancia ($\neq < >$) mediante la prueba Tukey (0.05)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Análisis de viabilidad con tetrazolio y prueba de germinación en semilla de *Nolina micrantha*

7.1.1. Prueba de viabilidad de semillas

Para determinar la viabilidad de semillas, se observó el patrón de tinción utilizando el estereoscopio, el resultado fue de 27 embriones teñidos de las 50 (Anexo 1) y este valor corresponde al 54 % de semillas viables (Figura 5).

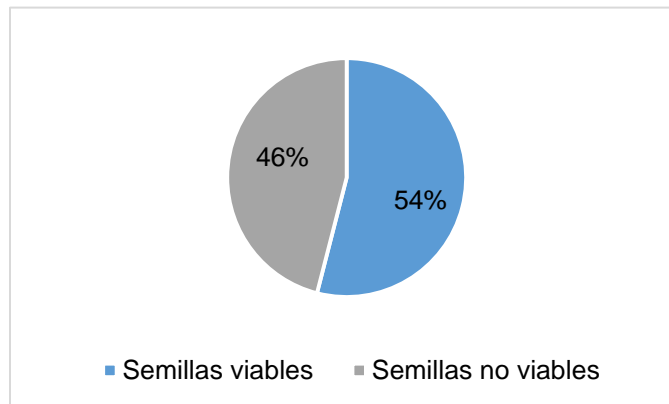


Figura 5. Se consideró viables a los embriones teñidos obteniendo 23 semillas no teñidas (46 %) y 27 como teñidas (54 %).

De acuerdo al resultado, la pigmentación de los embriones; considerandos viables con alto vigor, cuando fueron totalmente teñidos (SNICS, 2018). Estudios realizados en *Hechtia perotensis* (*Bromeliaceae*), en diferentes años de colecta (2012 y 2015) registraron resultados de 36 % de embriones viables para el año 2012 y 87 % para el 2015 (Elizalde *et al.*, 2016). Nuñez-Coronado (2017) reporta para *Calibanus hookerii* un 86% de semillas viables al 0.1% de sal de tetrazolio. En Ambos estudios demuestra que la viabilidad está relacionada con la longevidad de la semillas, lo que se confirma en este estudio donde la proporción de semillas viables y no viables de *Nolina micrantha* varía su calidad fisiológica en dependencia del año de colecta.

Por otra parte la técnica de tinción de los embriones puede ser poco convincente, en muchas ocasiones es posible tomar la poca coloración como embrión no viable, sin embargo, al establecer para su germinación, estas pueden germinar, tener un desarrollo y crecimiento favorable con las condiciones adecuadas como lo es el cultivo *in vitro*.

7.1.2. Prueba de germinación *in vitro*

Los resultados obtenidos indican la velocidad de germinación (Figura 6b) de las plántulas de acuerdo del tiempo de incubación (30 días) y número de semillas germinadas en cada repetición (Anexo 4). Esto revela que en la repetición 2 se encontró el mayor porcentaje de germinación y la máxima velocidad de emergencia, por otra parte, se registró el crecimiento de las plántulas formadas desde su germinación (Anexo 5), en función del tamaño, registrando la altura máxima y mínima (Tabla 4).

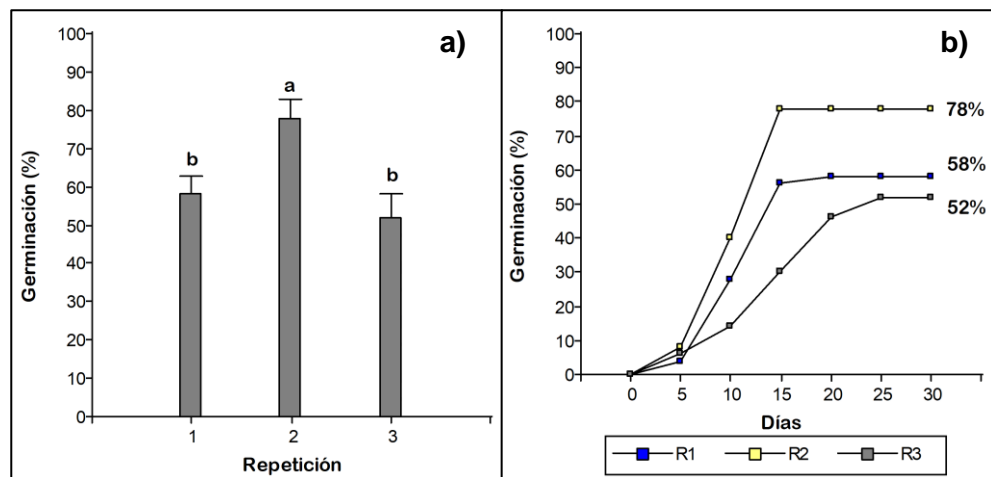


Figura 6. a) Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey. **b)** Velocidad de germinación en 30 días con sus respectivas repeticiones; obteniendo la mayor velocidad en la repetición 2 (R2) con un 78% de germinación en 30 días.

Tabla 4. Altura máxima y mínima en 30 días, de plántulas obtenidas en la germinación *in vitro* con las condiciones adecuadas en temperatura, luz, humedad y nutrientes.

Repeticición	Máxima	Mínimo	Promedio
1	12.5	6.3	9.14
2	12.5	7.6	10.20
3	11.3	3	7.42

La determinación de la germinación y la calidad en semillas está conformado por las siguientes características: físicas, fisiológicas, genéticas y sanitarias cuyo objetivo es conocer el potencial de la semilla durante la germinación, desarrollo en campo y requerimientos particulares durante su almacenamiento (Avendaño-López *et al.*, 2015) debido a que tiene gran importancia para la producción agropecuaria, es por esto por lo que la prueba de germinación ayuda a reconocer el porcentaje de semillas que no germinaron, ya sea estar latentes, abortadas, o tener embrión dañado (Elizalde *et al.*, 2017). Durante la germinación de la semilla de *Nolina micrantha* se registró que la raíz es la primera estructura en brotan del embrión, emergiendo la radícula a los 4 días. En este estudio la prueba mostró mayor geminación en la repetición 2 con (79 %), por lo que se considera con diferencias significativas a las repeticiones 1 (58 %) y 3 (52 %) de germinación respectivamente (Figura 6a), al calcular el promedio de las 3 repeticiones en germinaciones se tiene un 68 % de germinaron.

Flores-García *et al.* (2009) confirma que sumergir la semilla en peróxido de hidrogeno (3 %) y mantenerla en agitación durante 24 h proporciona buenos resultados en desinfección en *Nolina parviflora*. En algunas semillas de pino el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ha demostrado que incrementa la germinación, debido a que ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno, aunado a su efectiva capacidad de esterilización (Barnett, 1998). Ambas estudios, apoyan los resultados obtenidos, ya que como tratamiento pregerminativo para las semillas de *Nolina micrantha* se utilizó H₂O₂ al 1% por 1 h y se registró un bajo porcentaje de contaminación y un porcentaje de germinación mayor al 50%.

También bajo condiciones *in vitro* se han registrado resultados de germinaciones de (> 89 %) para *Beaucarnea gracilis*, *B. recurvata* y *B. inermis* (Osorio-Rosales & Mata-Rosas, 2005; Reyes-Silva *et al.*, 2013; Guillén *et al.*, 2015). Nuñez-Coronado (2017) en *Calibanus hookerii* reporta la germinación con 2 tratamientos (con testa y sin testa) de 40 % y 30 % respectivamente, por lo que los valores de germinación de las semillas tiene el porcentaje (68 %) adecuado en otras especies.

La calidad de las semillas y los porcentajes de germinación en *Nolina micrantha* dependen de los factores internos y externos que logran impedir la germinación en las semillas. Entre los factores que terminan la calidad de la semilla se pueden señalar: la luz, humedad, temperatura, cubierta seminal dura, embrión inmaduro, postmaduración, presencia de inhibidores, procedencia, madurez, año semillero y tiempo de cosecha (Devlin, 1982; Avendaño-López *et al.*, 2015; Elizalde *et al.*, 2017). Al realizar los lavados para el establecimiento aséptico, en específico con el peróxido de hidrogeno al 1%, las semillas de *Nolina micrantha* desprende una cubierta testal o endospermo que podría actuar como una barrera mecánica en la salida del embrión o en el intercambio hídrico y gaseoso (López-Granados & García-Torres, 1986; Barnett, 1997; Cardina y Sparrow, 1997; Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Es posible que las semillas de *Nolina micrantha* germinen en condiciones específicas como la temperatura, luz, humedad, concentraciones de gases y otras); por lo cual *Nolina micrantha* podría tener latencia morfofisiología o combinada, latencia endógena y latencia exógena (Anexo 3), tal como lo reporta Juárez (2014) y Castillo-Quiroz *et al.* (2018) en *Nolina cespitifera* Trel.

7.2. Multiplicación *in vitro* (Organogénesis directa)

Siguiendo los procedimientos de Murashige (1974) para micropropagar y de Reyes-Silva *et al.* (2013) en los géneros *Beaucarnea*, *Dasylyrion* y *Nolina* en micropropagación. Los resultados obtenidos en *Nolina micrantha* con la concentración de 0.5 mg/L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), fueron con una media de 0.30 brotes por explante, en cuanto a la concentración de 4 mg/L⁻¹, se registraron 5.83 brotes por explante (Figura 7a), observado los resultados a los 15 días (Anexo

8); para tener la certeza del conteo y de más formación de brotes se esperaron 30 días para realizar el conteo final de brotes formados. De igual manera se registraron las pruebas con la adición de BAP (0.5 mg/L^{-1}) y de ANA (0.4 mg/L^{-1}) donde se registraron escasos resultados visibles, solo con la morfogénesis del explante de la base apical caulinar y en ocasiones una masa de callo sin llegar a formar plántulas verdaderas (Anexo 7).

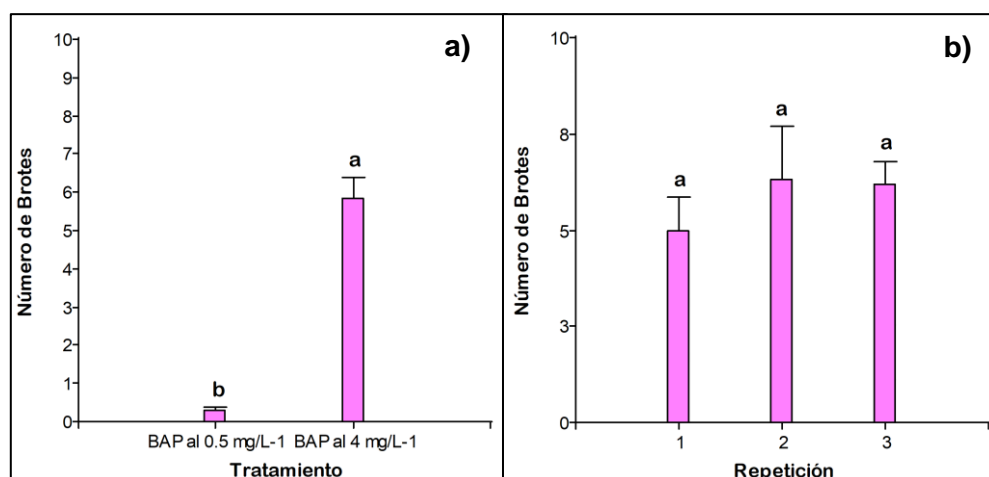


Figura 7. a) Se obtuvo 5.83 brotes por explante a 4 mg/L^{-1} y de 0.30 brotes por explante a 0.5 mg/L^{-1} de BAP. **b)** Promedio de brotes en R1= 5.00, R2= 6.30, R3= 6.20 y. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey.

Estudios similares por ejemplo Castañeda-Nava (2007) reporta la proliferación de yemas axilares en *Beaucarnea recurvata* Lemaire en diferentes concentraciones de BAP ($0.0, 2.5, 5.0$ y 7.5 mg/L^{-1}) obtenido buenos resultados en las concentraciones de 2.5 mg/L^{-1} (8.12 brotes por explante) y 5.0 mg/L^{-1} (10.93 brotes por explante). Por su parte, Nuñez-Coronado, 2017 obtiene un promedio de 26 brotes por semilla a 5 mg/L^{-1} de BA en *Calibanus hookerii*. Por su parte Reyes-Silva *et al.* 2013, reporta la formación de brotes con diferentes citocininas, en este caso con BAP, obtiene en *Beaucarnea goldmanii* con 3.9 brotes por explante a 3 mg/L^{-1} , *Beaucarnea gracilis* con 9.4 brotes a 4 mg/L^{-1} , *Dasyllirion leiophyllum* con 10.3 a 3 mg/L^{-1} , *Dasyllirion lucidum* con 6.8 a 4 mg/L^{-1} , *Nolina durangensis* 8.7 a 3 mg/L^{-1} , *Nolina longifolia* con 7.7 a 4 mg/L^{-1} y de *Nolina parviflora* 2.9 brotes por explante a 4 mg/L^{-1} . En estudios

más recientes Cruz-Cruz, (2017), en *Dassylirion cedrosanum* Trel., alcanzado un promedio máximo de 3.5 brotes por explante cuando el medio fue adicionado con 2.0 mg/L^{-1} de BAP. Con los resultados obtenidos con *Nolina micrantha* los números de brotes formados son similares con estudios realizados por los autores mencionados, esto es debido a que las citocininas influyen sobre el desarrollo y fisiología de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, control de la dominancia apical, interacción planta-patógeno, desarrollo de flores y frutos y senescencia de hojas, entre otros (Shimizu & Mori, 2001). Estos procesos también son influenciados por estímulos como la luz y otros fitorreguladores, los resultados fisiológicos y de desarrollo reflejan respuestas altamente dependientes de estos estímulos.

7.3. Rizogénesis de plantas obtenidas *in vitro*

En cuanto a esta parte del experimento no se encontró otras investigaciones a la inducción para formar raíces secundarias o adventicias; pero si existen investigaciones con especies de la subfamilia *Nolinoideae* en la estimulación con auxinas para la formación de raíces a partir de brotes, obtenidas en organogénesis directa e indirecta, incluso en embriogénesis somática.

En este experimento se utilizaron 10 plántulas como testigo sin auxinas, con un promedio de 3.2 raíces por plántula obtenida en la germinación *in vitro*. Ahora con regulador de crecimiento (auxina a 0.4 mg/L^{-1}) se utilizaron 30 plántulas divididas en 3 repeticiones de 10 plántulas con un promedio de 3 raíces por plántula (Anexo 9). Los resultados obtenidos de raíces secundarias, se registraron a los 21 días (Anexo 10).

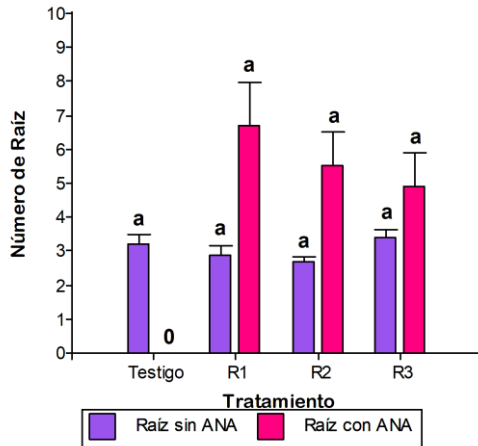


Figura 8. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) con la prueba Tukey. Para Raíz sin ANA formadas en germinación (Raíces primarias) en Testigo= 3.20, R1= 2.90, R2= 2.70 y R3= 3.40. Para Raíz con ANA (raíces secundarias) en Testigo= 0.0, R1= 6.70, R2= 5.50 y R3= 4.90 en promedio de raíces por plántulas.

Las auxinas intervienen en la división celular, elongación de tallos, coleóptilo, dominancia apical y sobre todo la inducción de enraizamiento (Pimienta *et al.*, 2006) y con el experimento realizado se comprobó al obtener nuevas raíces. En el estudio no se registraron diferencias significativas en raíces obtenidas en la germinación *in vitro*, sin regulador; de igual manera al adicionar ANA al 0.4 mg/L^{-1} no se registraron diferencias significativas en las 3 repeticiones, en cuanto al testigo no se presenta formación de raíces secundarias, esto se debe a la carencia de una fuente externa de ácido naftalenacético (Figura 8).

Algunos estudios en *Nolina parviflora* (Flores-García *et al.*, 2009), al enraizarlas con ANA a concentraciones de $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ obtienen de 1.5 a 2.00 raíces por brote y a concentraciones de $1.0 \text{ }\mu\text{M}$ obtuvieron de 1.00 a 1.25 en promedio de raíces por brotes. El uso de auxinas para promover el enraizamiento no siempre es necesario, por ejemplo, Reyes-Silva *et al.* (2013) reporta el enraizamiento de diferentes especies de la subfamilia *Nolinoidea* sin el uso de auxinas, donde obtiene para *Nolina longifolia* 75% (medio MS al 50%) y 83% (medio MS 2 g/L^{-1} de carbón activado), *Nolina duranguensis* (77% y 86%) y *Nolina parviflora* (90% y 95%). Sin embargo, no siempre funciona así y del por qué no es muy claro, pero si sabemos que la parte basal hay hasta siete veces más de acumulación de auxinas en la parte

inferior de un tallo que en la superior (Fisher, 1975). Se registró que al adicionar auxina (ANA) se ayudó a la formación de raíces adventicias, cabe recalcar que el enraizamiento en *Nolina micrantha* no fue a partir de brotes sino de plántulas obtenidas de germinación *in vitro*, y por esta razón se requiere de auxinas para estimular y acelerar en la formación de raíces, además de que las plántulas no se le adiciono ningún regulador como citocininas, ya que es un factor en la formación de raíces como el caso de la micropropagación de diferentes Nolinoideas donde no es necesario el uso de auxinas (Reyes-Silva *et al*, 2013).

7.4. Aclimatación de las plántulas a partir de germinación *in vitro*

Obtenidas las plántulas de la germinación *in vitro*, en este caso de la tercera repetición donde se registraron 27 plántulas germinadas de 50 semillas. Estas plántulas se llevaron a un área de aclimatación con las condiciones de temperatura y humedad controlada. El resultado fue de 17 plántulas aclimatadas (Figura 9) registrando el proceso a un mes y a un año (Anexo 11).

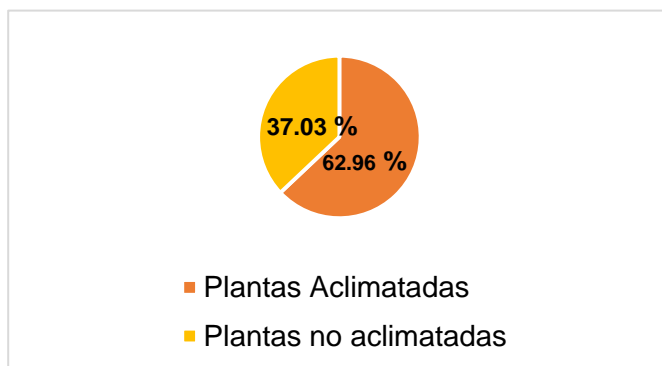


Figura 9. La aclimatación con sustrato peat moss, perlita y vermiculita a una relación (8:1:1) con las condiciones adecuadas, se obtuvo 17 plántulas aclimatadas es decir un 62.96 %.

Los resultados obtenidos con *Nolina micrantha* difieren de Osorio & Mata (2005) quienes reportan la aclimatación del 80 % para *Beaucarnea gracilis* y un 92 % de aclimatación para *Beaucarnea recurvata* con una temperatura de 30° C y una humedad relativa de 90 % hasta quedar al 50 %. Aclimataciones de Reyes-Silva *et*

al. (2013) en diferentes géneros de *Nolinoidea*, reporta en *Nolina duranguensis* donde mostro valores inferiores al 50 %, mientras que en otra especies reporta supervivencia de entre 75 a 100 %. Con los resultados obtenidos se considera que la supervivencia no es bajo, debido a que la adaptación de la planta a *ex vitro* depende de la respuesta al cambio en la humedad relativa del ambiente, por ello se debe de hacer un proceso gradual en específico para ese factor

La propagación *in vitro* de tejidos vegetales, es una clonación, es decir que no existen variaciones genéticas en estas plantas obtenidas. Sin embargo, se tienen poblaciones celulares dentro de cada tejido y esas se van a expresar en individuos con ciertas diferencias. Es decir que el cultivo de tejidos no es una clonación verdadera y comprobada, ya que se obtienen individuos semejantes pero que tienen la variabilidad genética de las poblaciones naturales que se encuentran en los distintos tejidos de las plantas; no son idénticos y presentan algunas diferencias.

Estas diferencias se presentan por factores como genética preexiste en el explante (D'Amato, 1977) o inducida durante la fase de cultivo *in vitro* (Evans *et al.*, 1984), la des-diferenciación y rediferenciación durante el cultivo *in vitro*, variación ésta que Larkin y Scowcroft (1981) definieron como variación somaclonal, también está relacionada directa o indirectamente con modificaciones del ADN, específicamente hipo e hipermetilación (Scowcroft *et al.*, 1987; Phillips *et al.*, 1990).

En relación al cultivo *in vitro* empleado, ha sido reportada que cuando las plantas regeneradas por micropropagación, la variación genética generada es mínima o nula, seguida por la embriogénesis somática y la organogénesis, que produce una mayor proporción de *in vitro* plantas con variaciones genéticas (Yang *et al.*, 1999).

Por el sistema de propagación de *Nolina micrantha*, el cual es por organogénesis directa, se considera que existe variación genética de los brotes obtenidos, todos los factores mencionados además de que *Nolina micrantha* es una especie dioica, la variabilidad que se puede presentar, será representativa al polinizarse con otra planta, aunque esta deducción tendría que sustentarse con una análisis molecular de las plantas obtenidas *in vitro*.

VIII. CONCLUSIÓN

La germinación *in vitro* en semillas de *Nolina micrantha* es viable, sin embargo, por la latencia encontrada y el tiempo de almacenamiento disminuyó el porcentaje de germinación.

Se logró la formación de brotes (organogénesis directa) a partir del tejido meristemático apical caulinar al adicionar citocininas al medio de cultivo como regulador para la inducción de brotes.

Así mismo el cultivo *in vitro* se logró la formación de raíces secundarias al adicionar auxinas al medio de cultivo, obtenido resultados concisos.

Por la distribución restringida, *Nolina micrantha* es una especie rara y endémica para la ecorregion del desierto chihuahuense.

Se concluye esta técnica como una estrategia para la conservación de *Nolina micrantha* de igual forma se sugiere como un protocolo para ser utilizado en otras especies de la subfamilia *Nolinoidea*.

IX. RECOMENDACIONES

De acuerdo con la revisión bibliográfica se encontraron semejanzas en las características descritas en la clasificación taxonómica de *Nolina micrantha*, *N. texana* y *N. arenicola*, con diferencia en la coloración de las inflorescencia, por lo que se sugiere revisar los ejemplares de estas especies con el fin de confirmar su identidad como especie o reubicarlas taxonómicamente.

LITERATURA CITADA

- Angevine, M. W. & B. F. Chabot. (1979).** Seed Germination Syndromes in Higher Plants. In: Solbrig, O.T., Jain, S., Johnson, G.B., Raven, P.H. (eds) Topics in Plant Population Biology. Palgrave, London. pp. 188–206.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). (1998).** An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85: 531-553.
- APG II. (2003).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 399-436.
- APG III. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105-121.
- APG IV. (2016).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 181: 1–20.
- Avendaño-López, A., M. Quintana-Camargo, J. Padilla-García & M. Arriaga-Ruíz. (2015).** Análisis de semilla de *Pinus devoniana* con rayos X. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 2(4): 556-560
- Bandyopadhyay, A., P. C. Nautiyal, T. Radhakrishna & H. K. Gor. (1999).** Role of Testa, Cotyledons and Embryonic Axis in Seed Dormancy of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 182 (1): 37-41.
- Barnett, J. P. (1976).** Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. *Tree Planters' Notes*. 27(3): 17-19, 24.
- Barnett, J. P. (1997).** Relating pine seed coat Characteristics to Speed of germination, Geographic Viriakm, and Seedling Development. *Tree Plant Notes*. 48(1&2): 38-42.
- Barnett, J. P. (1998).** Disinfecting seeds with hydrogen peroxide. <http://www.sfws.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. p. 3.

- Baskin, C. C. & J. M. Baskin. (2004).** A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14:1-16.
- Baskin, C. C. & J. M. Baskin. (2014).** *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. (2nd ed.). CA: Academic Press. San Diego. pp. 1600.
- Bell, W. H. & E. F. Castetter. (1941).** The utilization of yucca, sotol, and beargrass by the aborigines in the American Southwest. University of New Mexico biological series, Vol. 5, No. 5, University of New Mexico bulletin, whole no. 372, Ethnobiological studies in the American Southwest, pp. 75.
- Bentham, G. & J. D. Hooker. (1883).** *Genera Plantarum III*. Reeve and Co., London. pp. 780- 781.
- Bogler, J. D. (1994).** Taxonomy and Phylogeny of *Dasyilirion (Nolinaceae)*, PhD. Thesis, University of Texas at Austin, Austin, Texas, U.S.A. p. 583.
- Brummitt, R. K. (1992).** Vascular Plant Families and Genera. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 11901– 11946, 1203 – 12057.
- Cardina, J. & D. H. Sparrow. (1997).** Temporal Changes in Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Seed Dormancy. *Weed Science*, 45(1): 61–66.
- Castañeda, J. J. (2009).** Propagación *in vitro* de Pata de Elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (*Nolinaceae*)) por Medio de la Proliferación de Yemas Axilares. Num. 399283645. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. p. 42.
- Castillo, A. (2004).** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay. p. 8.
- Castillo-Quiroz, D., A. Antonio-Bautista, D. Y. Ávila-Flores, J. T. Sáenz-Reyes & F. Castillo-Reyes. (2018).** Tratamientos Químicos y Biológicos Para Estimular la Germinación en Semillas de *Nolina cespitifera* Trel. *Polibotánica*. num. 45. pp. 147-156.
- Chee, R. & R. M. Pool. (1982).** The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures *in vitro*. *Scientia Hort*. 16: 17-27.

- Clemente, M. M. (1994).** Bancos de Germoplasma Vegetal. En: Hernández, B. E, y Clemente, M. M. (eds). Protección de la flora en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Cultura y Medio Ambiente. Agencia del Medio Ambiente, Andalucía, España. p. 125-131.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2018).** 100 años de conservación en México: Áreas Naturales Protegidas de México. semarnat-conanp. p. 634.
- Cronquist, A. (1981).** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York. p. 248-250.
- Cruz, A. (18 de noviembre 2020).** Comunicación personal de *Nolina micrantha*
- Cruz-Cruz, J. (2017).** Germinación *In Vitro* y Micropropagación de Sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 45.
- D'Amato, F. (1977).** Nuclear cytology in relation to development. CUP Archive. p. 283.
- Dahlgren, R. M., H. T. Clifford & P. F. Yeo (1985).** The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag, Nueva York. pp. 371-394.
- Davies, P. J. (1995).** The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (PJ Davies, ed.). Kluwer Acad. Publ. The Netherlands. pp. 1-12.
- Dayrell, R. L., Q. S. García, D. Negreiros, C. C. Baskin, J. M. Baskin, & F. A. Silveira. (2016).** Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. *Annals of Botany*. 119: 154-159.
- De Fossard, R. A. (1984).** Tissue culture for plant propagators. (2 ed.). University of New England, Department of Botany, Armidale, Australia. p. 409.
- Devlin, R. M. (1982).** Fisiología Vegetal. Cuarta edición. Ed. Omega, S. A. Barcelona. pp. 471-481.
- Dumroese R. K., R. L. James, D. L. Wenny & C. J. Gilligan. (1988).** Douglas-fir seed treatments: Effects on seed germination and seedborne organisms. In:

Proceedings: Combined Meeting of the Western Forest Nursey Council, Intermountain Nursery Association and Forest Association of British Columbia. pp. 155-160.

- Elizalde, V., J. R. García, C. B. Peña-Valdivia, M. C. Ybarra, O. R. Leyva & C. Trejo. (2016).** Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (*Bromeliaceae*). *Revista de Biología Tropical*. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744). 65 (1): 153-165.
- Engler, A. (1888).** Liliaceae. En: Engler A. & K. Prantl Eds. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien T2, Ab5*, Verlag, Leipzig. pp. 10-91.
- Ertola, R. J., A. M. Giulietti & F. J. Castillo. (1994).** Design, formulation and optimization of media. In: *Bioreactors Systems Design* (J Asenjo y J Merchuk, eds.). Marcel Dekker. New York. USA. pp. 89-137.
- Evans, D. A., W. R. Sharp & H. P. Medina-Filho. (1984).** Somaclonal and gametoclonal variaton. *American Journal of Botanical*. 71: 759-774.
- Fisher, J. B. (1975).** Eccentric secondary growth in *Cordyline* and other *Agavaceae* (*Monocotyledonae*) and its correlation with auxin distribution. *American Journal of Botany*. 62: 292-302.
- Flores-García, A., J. G. Álvarez-Moctezuma, J. L. Rodríguez de la O & A. Corona-Ambris. (2009).** Respuestas Organogénicas *in vitro* de *Nolina parviflora* (H.B.K) Hemsl. *Foresta veracruzana*. Recursos Genéticos Forestales. Universidad Veracruzana. 11(1): 25-32.
- Footitt, S., I. Douterelo-Soler, H. Clay & W. E. Finch-Savage, (2011).** Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 108(50): 20236-20241.
- Franco-Martínez, I. S. (1995).** Conservación *in situ* y *ex situ* de las Agaváceas y Nolináceas Mexicanas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 57: 27-36.
- Gamborg, O. L. (1970).** The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol*. 45: 372-375.

- Gamborg, O. L., R. A. Miller & K. Ojima. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gamborg, O. L., T. Murashige, T. A. Thorpe & I. K. Vasil. (1976).** Plant tissue culture media. *In vitro.* 12: 473-478.
- García, P. F. & L. J. Martínez. (1994).** Introducción a la Fisiología Vegetal. Primera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 218.
- García-Mendoza, A. & R. Galván. (1995).** Riquezas de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 56: 7-24.
- García-Mendoza, A., E. Solano & M. Rivera-Lugo. (2012).** *Nolina excelsa* (*Nolinaceae*) una Nueva Especie del Estado de Oaxaca, México, *Botanical Science.* 90 (1): 21-25.
- Ghildiyal, S. K., C. M. Sharma & V. P. Khanduri. (2007).** Improvement in germination of Chirpine (*Pinus roxburghii*) by a presowing treatment with hydrogen peroxide. *Journal of Tropical Forest Science.* 19: 113–118.
- Golubov, J., M. C. Mandujano, S. Arizaga, A. Martínez-Palacios & P. Koleff. (2007).** Inventarios y conservación de *Agavaceae* y *Nolinaceae*. En: Colunga-García, Marín, P., A. Larqué-Saavedra, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal (Eds.). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves.* Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. pp. 133-152.
- Gray, W. M., & M. Estelle. (1998).** Biochemical genetics of plant growth. *Current Opinion in Biotechnology.* 9(2): 196–201.
- Guillén, S., A. Martínez-Palacios, H. Martínez & J. G. Martínez-Ávalos. (2015).** Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (*Asparagaceae*), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences.* 93(2): 221-230.
- Harper, J. L. (1997).** *The Population Biology of Plants.* Academic Press. New York. U.S.A. p. 892.
- Heller, R. (1953).** Recherches sur la nutrition minerale des tissues vegetaux cultives in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14: 1-223.

- Heller, R. (1954).** Les besoins minéraux des tissus en culture. *Année Biolog.* 30: 260-281.
- Henrickson, L. & M. C. Johnston. (2004).** In prep. A Flora of the Chihuahua Desert region. Edition 1.5, CD version.
- Hernández, B. E. (1994).** Técnicas integradas o técnicas *ex situ-in situ*. Una estrategia para Andalucía. En: Hernández B. E, Clemente, M. M, eds. Protección de la flora en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Cultura y Medio Ambiente. Agencia del Medio Ambiente, Andalucía, España. pp. 159-166.
- Hernández-Sandoval, L. G. & B. B. Simpson. (1994).** Análisis Filogenético de *Beaucarnea* y Géneros Afines. (*Nolinaceae*), Certamen investigación de excelencia “Gral. Y Lic. Bernardo López García”, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas.
- Hernández-Sandoval, L. G. (2019).** Catálogo Nomenclatural de la Familia *Nolinaceae* Nakai en México. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Bases de datos SNIB-CONABIO proyecto KT011. México, Ciudad de México. p. 19.
- Hernández-Sandoval, L. G. (2020).** Familia *Nolinaceae*: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 213. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, México. p. 42.
- Hess, W. (2002).** *Nolina* Michaux. In: Flora of North America .Editorial Committee. Eds. Flora of North America. Vol. 26 *Magnoliophyta*: Liliidae: Liliales and Orchidales, Oxford University Press, Nueva York. pp. 413-419: 419.
- Hochstätter, F. (2010).** Il Genere/The genus *Nolina* (*Nolinaceae*). Gli Speciali di Pianta Grasse. Associazione Italiana Amatori delle Piante Succulente, Bologna. pp. 1-4, 20, 37 – 39.
- Huang, Z., H. Ölçer-Footitt, S. Footitt & W. E. Finch-Savag. (2015).** Seed dormancy is a dynamic state; variable responses to pre-and post-shedding environmental signals in seeds of contrasting *Arabidopsis* ecotypes. *Seed science Research.* 25: 159-169.

- Hutchinson, J. (1934).** The Families of Flowering Plants. Vol II. Monocotyledons. Macmillan, London. p. 243.
- Jiménez-González, E. (1998).** Generalidades del cultivo *in vitro*. In: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología (JN Pérez Ponce, ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba. pp. 13-24.
- Johnston, I. M. (1943).** New Phanerogams From Mexico (V), Journal of the Arnold Arboretum. Vol. XXIV. pp. 516: 91.
- Juárez, D. A. (2014).** Eliminación de latencia en semillas de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.), bajo condiciones de laboratorio e invernadero, utilizando tratamientos físicos, químicos y mecánicos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila. p. 90.
- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens & M. J. Donoghue. (2008).** Plant systematic: A phylogenetic Approach Sinauer Associates, Sunderland. p. 611.
- Jurado, E. & J. Flores. (2005).** Is seed dormancy under environmental control or to plant traits? Journal of Vegetation Science. 16: 559-564.
- Krause, K. (1930).** Liliaceae. En: Engler A. & K. Prantl. Eds. Die Natürlichen Pflanzenfamilien Band 15a, Wilhelm Engelmann, Leipzig. pp. 227-386.
- Krikorian, A. D. (1991).** Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones (W. M Roca y L. A Mroginski, eds.). CIAT. Cali, Colombia. pp. 41-70.
- Kubitzki, K. & P. J. Rudall. (1998).** *Asparagaceae*. In: Kubitzki, K. (eds) Flowering Plants · Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 125-130.
- Larkin, P. J. & W. R. Scowcroft. (1981).** Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures of plant improvement. Theor, Appl. Genet. 60: 1-16.
- Litz, R. E. & R. L. Jarret. (1991).** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivos de Tejidos en la

- Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones (W. M Roca y L. A Mroginski, eds.). CIAT. Cali. Colombia. pp. 143-152.
- Llorente, B. E. (2002).** Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina. p. 201.
- López-Granados, F. & L. García-Torres. (1986).** Effects of environmental factor on dormancy and germination of crenate broomrape (*Orobanche crenata*). Weed sci. 44 (2): 284-289.
- McVaugh, R. (1989).** *Nolina* Michaux. En: Anderson W.R. Ed. Flora Novo-Galiciana: *Bromeliaceae* to *Dioscoreaceae*., The University of Michigan Herbarium, Ann Arbor. (15): 240-244.
- Michaux, A. (1803).** Flora Boreali-Americana, sistens characteres plantarum quas in America septentrionali collegit et detexit. Instituti Gallici Scientiarum, necnon Societatis Agriculturae Caroliniensis socius. pp. 330: 207.
- Murashige, T. & F. Skoog. (1962).** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobáceo tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murashige, T. (1974).** Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
- Nakai, T. (1943).** Ordines, Familiae, Tribi, Genera, Sectiones... novis edita. Appendix. Quaestiones characterium naturalium plantarum. Chosakuronbun Mokuroku. pp. 226.
- Naturalista. (2023).** Descarga 18 de Febrero de 2023, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <https://www.naturalista.mx/observations/11087206>, Observación de Leticia Jimenez Hernandez (leticia_jimenez) y <https://www.naturalista.mx/observations/9307824>, Observación de Arturo Cruz (arturoc). México.
- NOM-059-2010- SEMARNAT. (2010).** Diario Oficial de la Nación, México D.F.
- Nuñez-Coronado, C. (2017).** Morfología, germinación y micropropagación de *Calibanus hookerii* para su conservación. Tesis de maestría. Montecillo, Texcoco, Edo. México, México. p. 101.

- Ohira, K., I. Makoto & K. Ojima, (1976).** Thiamine requirements of various plant cells in suspensión culture. *Plant Cell Physiol.* 17(3): 583-590.
- Osorio-Rosales, M. L. & M. Mata-Rosas (2005).** Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *HortScience.* 40: 1481-1484.
- Paniego, N. B. (1995).** Producción de lactonas sesquiterpénicas por cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Tesis. Facultad Farmacia y Bioquímica. UBA. Argentina.
- Pence, V. C. (2011).** Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 47: 176-187.
- Pérez-García, F. & J. Pita-Villamil. (2001).** Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Eds: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. ISBN: 84-491-0503-X. p. 16.
- Phillips, R. L., S. M. Kaepler & V. M. Peschke. (1990).** Do we understand somaclonal variation? En Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.* Kluwer. Amsterdam, Holanda. p. 227.
- Pimienta B. E., A. Muños, B. Ramírez & L. Méndez. (2006).** Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara. p. 331.
- Poinar, H. N., M. Kuch, K. D. Sobolik, I. Barnes, A. B. Stankiewicz, T. Kuder, W. G. Spaulding, V. M. Bryant, A. Cooper & S. Pääbo. (2001).** A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 98: 4317-4322.
- Poole, J. M., W. R. Carr, D. M. Price & J. R. Singhurst. (2007).** Rare Plants of Texas. Texas A&M University Press College Station. p. 640.
- Quintanilla-Moreno, K. M. (2015).** Micropropagación de plátano enano (*Musa spp*) utilizando manos de flores masculinas inmaduras con diferentes concentraciones de desinfectantes y reguladores de crecimiento. *Producción Agropecuaria Y Desarrollo Sostenible.* 3: 51–59.

- Ramón, M. & C. Mendoza. (2002).** Efecto del deterioro post-corte sobre la germinación de la semilla asexual de cinco variedades de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron.* 19(4): 264-272.
- Reyes-Silva, A.I., C.F. Morales-Muñoz, M.E. Pérez-Reyes & E. Pérez-Molphe-Balch. (2013).** Propagación de Nolinaceas Mexicanas. *Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes.* 21(58): 12-20.
- Rice, R., P. Alderson., J. Hall & A. Ranchhod. (1992).** Micropropagation: principles and commercial practice. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology. Second Supplement* (M. Fowler, G. Warren & M. Moo-Young, eds.). pp. 130-149.
- Rivera-Lugo, M. & E. Solano. (2012).** *Nolinaceae* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, fascículo 99: 1 – 68.
- Rojas-Piña, V. (2015).** Estudio morfológico y sistemática molecular del complejo *Beaucarnea-Calibanus* y sus relaciones con *Nolina* y *Dasyilirion*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México. p. 87.
- Rojas-Piña, V., M. E. Olson, L. O. Alvarado-Cárdenas, & L. E. Eguiarte. (2014).** Molecular phylogenetics and morphology of *Beaucarnea* (*Ruscaceae*) as distinct from *Nolina*, and the submersion of *Calibanus* into *Beaucarnea*, *Taxon.* 63 (6): 1193-1211.
- Rzedowski, J. (1978).** *Vegetación de México.* Ed. Limusa, México D.F. p. 431
- Rzedowski, J. (1993).** Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. En: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J. (eds). *Biological diversity of Mexico. Origins and Distribution.* Oxford University Press, New York. pp. 129-144.
- Saad, A. I. & A. M. Elshahed. (2012).** Plant Tissue Culture Media. In A. Leva, & L. M. R. Rinaldi (Eds.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture.* IntechOpen. Winchester. pp. 29-40.
- Salisbury, F. B. & C. W. Ross. (1994).** *Fisiología Vegetal.* Grupo Editorial Iberoamericana. México. pp. 395-451
- Schenk, R. V. & A. C. Hildebrandt. (1972).** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199- 204.

- Scowcroft, W. R., R. I. S Brettell, S. A Ryan, P. A. Davies & M. A. Pallotta. (1987).** Somaclonal variation and genomic flux. En C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, y D. D. Biesboes (Eds.) Plant Tissue and Cell Culture Liss, Nueva York, U.S.A. pp. 275-288.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2018)-** <https://www.gob.mx/snics/es/articulos/como-saber-que-tan-viable-es-una-semilla?idiom=es>, 2018
- Shimizu, S. S. & H. Mori. (2001).** Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. Plant Physiol. 127: 1403-1413.
- Simpson, G. M. (1990).** Seed Dormancy in Grasses. New York: Cambridge University Press. p. 297.
- Standley, P. C. (1920).** Trees and Shrubs of Mexico, Contributions from the United States National Herbarium. Washington, DC. 23(1): 169.
- Styer, D. J. & C. K. Ghin. (1983).** Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. 5: 221-277.
- Takhtajan, A. (1980).** Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*), Botanical Review. 46: 225 – 359.
- Thorpe, T. A. & E. C. Yeung. (1982).** El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México). 51: 43-59.
- Torres, K. C. (1989).** Tissue culture techniques for horticultural crops. New York, London: Chapman and Hall. p. 224.
- Treviño-Carreón, J. (2004).** Ecología De Los Matorrales Rosetófilo De México: Patrones Geográficos Y Ecofisiológicos de las Comunidades de *Dasyllirion*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. p. 164.
- Van Jaarsveld, E & U. Egli. (2020).** *Asparagaceae*. In: Egli, U. & R. Nyffeler (eds) Monocotyledons. Illustrated Handbook of Succulent Plants. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 465–466.
- Verhoek, S. & W. J. Hess. (2002).** *Agavaceae* Dumortier. En: Flora of North America .Editorial Committee. Eds. Flora of North America. Volume 26

Magnoliophyta: Liliidae: Liliales and Orchidales, Oxford University Press, Nueva York. pp. 413-465.

Villalobos-Arámbula, V. M. & T. A. Thorpe. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones (Roca, W. M y Mroginski, L. A). CIAT. Cali. Colombia. pp. 127-142.

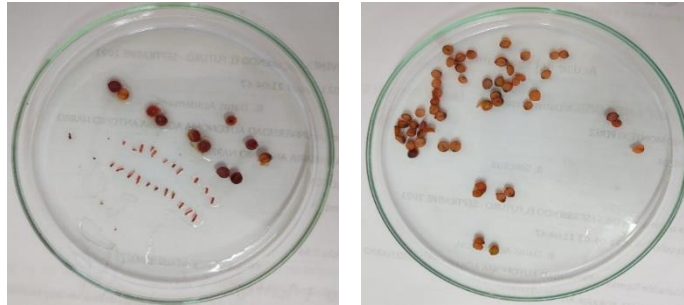
Villalobos-Arámbula, V. M. & A. García-Velázquez. (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. Agrociencia. 48: 107-118.

Walker, C. C. (2001). Nolina. En: Eggle U. Ed. Illustrated Handbook of Succulent Plants: Monocotyledons, Springer-Verlag, Berlin. pp. 291-292.

Wenny, D. L. & R. K. Dumroese. (1987). Germination of conifer seeds surfaced sterilized with bleach. Tree Planters' Notes. 38(3): 18-21.

Yang, H; Y. Tabei, H. Kamada & T. Rayano. (1999). Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigeninbased random amplified polymorphic DNA. Plant Cell Rep. 18: 520-526.

ANEXOS



Anexo 1. Prueba de viabilidad con sal de tetrazolio al 1%, obteniendo 27 embriones teñidos con una incubación de 30° C por 1h.



Anexo 2. La germinación *in vitro* con medio Murashige y Skoog al 100 %, se vio reflejado con el comienzo de la radícula a los 4 días (a), a los 10 días después del establecimiento (b), a los 30 días después del establecimiento (c).



Anexo 3. Desprendimiento de una cubierta testal como signo de latencia, obtenido a partir de la inmersión a peróxido de hidrógeno al 1 % por 1 hora.

Anexo 4. Resultados de germinaciones con medio MS al 100 %, dividido en 3 repeticiones (1, 2 y 3); con una incubación de 25 ° C por 30 días.

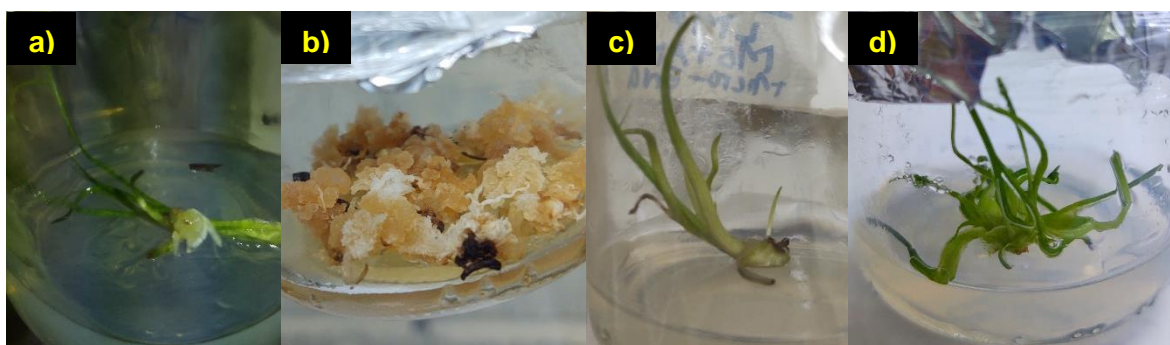
Número de Frasco	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3	Total
1	4	3	3	10
2	3	3	2	8
3	2	4	3	7
4	3	5	1	9
5	3	4	2	3
6	4	3	4	11
7	3	4	4	11
8	2	4	3	5
9	3	5	3	11
10	2	4	2	6
Total	29/50	39/50	27/50	97/150

Anexo 5. Altura de las plántulas (P1, P2, P3, P4 y P5) en cm a los 30 días después del establecimiento con sus respectivas repeticiones, espacios en blanco no hubo germinación.

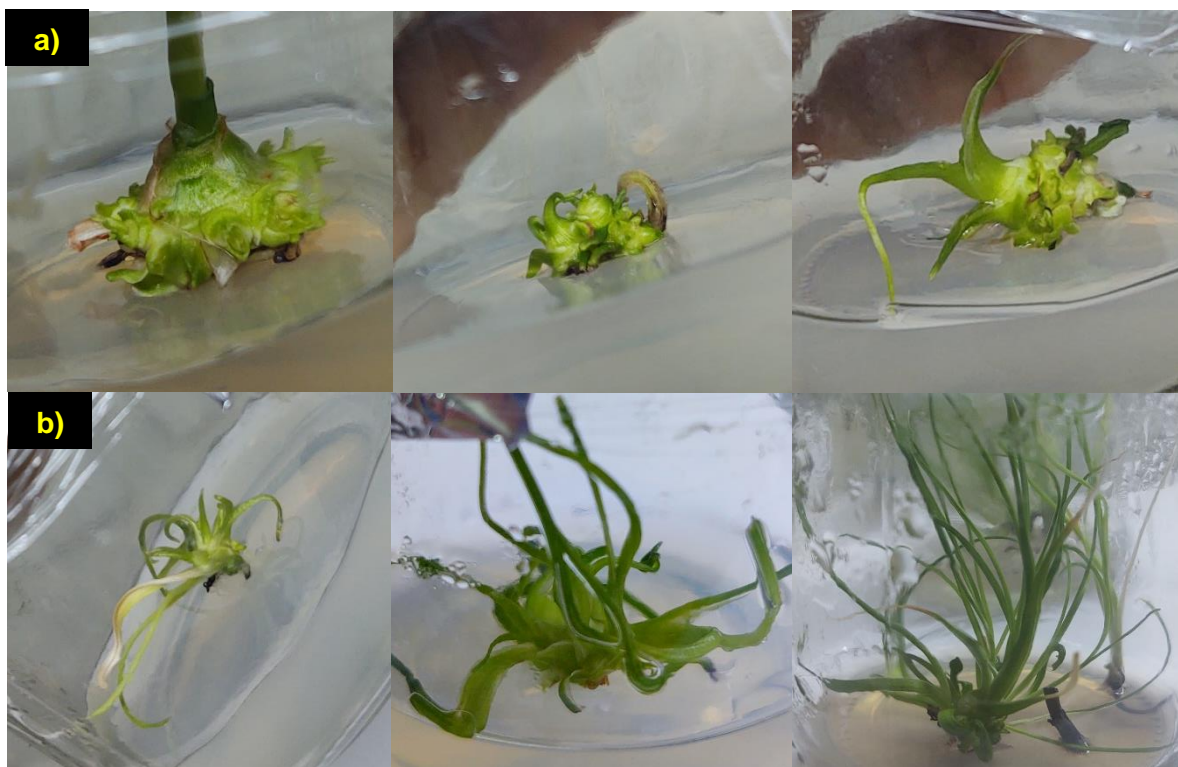
Repetición	Numero de Frasco	Numero de Germinación	Plántula 1	Plántula 2	Plántula 3	Plántula 4	Plántula 5
1	1	4	9.0	9.2	9.0	9.3	
	2	3	9.0	9.0			6.3
	3	2			9.1	9.4	
	4	3	9.0		12	9.0	
	5	3	9.0	9.3		9.3	
	6	4		12.5	9.4	8.7	9.0
	7	3	9.5	9.0			9.3
	8	2	6.8				8.0
	9	3	9.5	9.0			9.2
	10	2		9.1	9.3		
2	1	3	11.4		9.3		12.5
	2	3	9.3	10.2	7.8		
	3	4		9.0	9.7	12.0	10.3
	4	5	11.6	12.0	9.0	8.9	9.3
	5	4		11.4	10.1	11.3	8.9
	6	3	9.4	9.8	12.0		
	7	4	12.0	10.3		8.9	9.6
	8	4	7.6		9.5	10.9	11.0
	9	5	12.5	10.0	11.3	11.2	9.4
	10	4	8.3	9.7	9.5	12.0	
3	1	3	11.3	3.5	5.3		
	2	2			4.5		7.0
	3	3	3.0	4.0			8.4
	4	1				8.5	
	5	2	10.3				9.8
	6	4	10.0	6.5	3.5	6.7	
	7	4		10.5	10.2	10.2	10.0
	8	3	10.0	10.0	9.7		
	9	3		3.3		7.8	5.4
	10	2	7.5	4.3			

Anexo 6. Brotes obtenidos a partir de la adición de BAP al 4 mg/L⁻¹, establecidos en 3 repeticiones de un explante por frasco.

Explante	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	5	5	5
2	6	3	5
3	6	1	6
4	11	17	6
5	5	9	6
6	5	3	5
7	2	8	5
8	1	7	9
9	5	5	10
10	4	5	5
Total			175



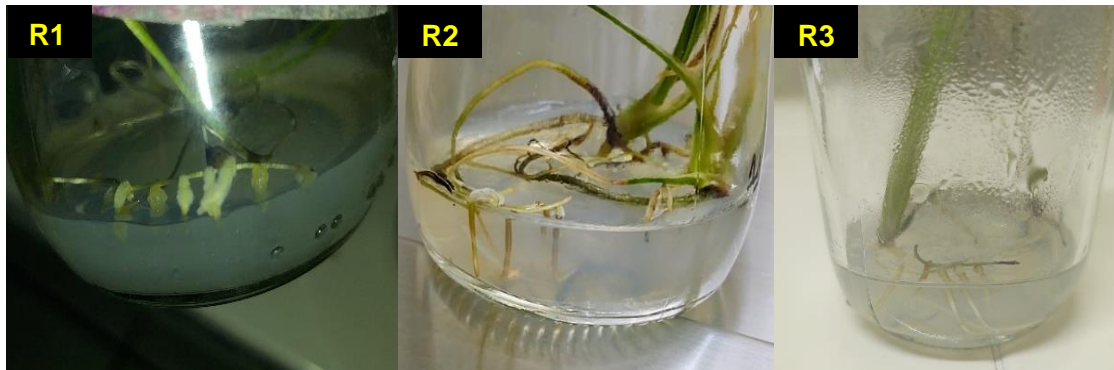
Anexo 7. Resultados en diferentes experimentos: **a)** combinación de ANA y BAP con tejido apical de la base caulinar, **b)** BAP al 0.5 mg/L⁻¹ con tejido meristemático apical, **c)** BAP al 0.5 mg/L⁻¹ y **d)** al 4 mg/L⁻¹ de BAP con tejido apical de la base caulinar.



Anexo 8. Proceso de formación de brotes a partir de organogénesis directa al añadir BAP al 4.00 mg/L^{-1} , **a)** formación de pequeños brotes sin diferenciación, **b)** diferenciación de brotes a plántulas.

Anexo 9. Efectos en formación de raíces adventicias con Ácido Naftalenacético (ANA), obteniendo resultados a los 21-25 días.

Frasco/Plantas	Testigo – Número de raíces		R 1 – Número de raíces		R 2 - Número de raíces		R 3 - Número de raíces	
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>
1/2	3(0)	4(0)	2(4)	3(10)	3(5)	2(7)	4(4)	3(9)
2/2	4(0)	2(0)	3 (6)	2 (3)	3(13)	3(7)	5(5)	4(12)
3/2	2(0)	3(0)	2(2)	5(11)	3(5)	2(2)	3(3)	3(5)
4/2	3(0)	3(0)	3(11)	3(6)	3(4)	2(6)	3(2)	3(2)
5/2	5(0)	3(0)	3(12)	3(2)	3(2)	3(4)	3(3)	3(4)
Total	0	0	35	32	29	26	17	32
Total general de raíces secundarias formadas								171



Anexo 10. Imágenes representativas de Repetición 1, 2 y 3 de rizogénesis de plántulas obtenidas a partir de germinación in vitro, con medio Murashige & Skoog adicionado con 0.5 mg/L^{-1} de Ácido Naftalenacético (ANA) para formación de raíces adventicias, observando resultados a los 21 días.



Anexo 11. Aclimatación en sustrato *peat moss*, perlita y vermiculita a una proporción (8:1:1), **a)** Trasplante 9 de julio de 2021, **b)** Aclimatación después de un mes 11 de agosto de 2021 y **c)** Plántulas a un año 10 de julio de 2022