

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA



Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de Candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

Por:

ERNESTO JUÁREZ LEÓN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de Candelilla (*Euphorbia
antisyphilitica* Zucc.)

Por: Ernesto Juárez León

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

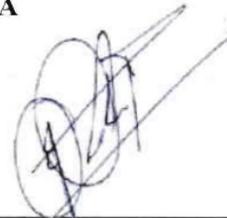
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Jurado examinador



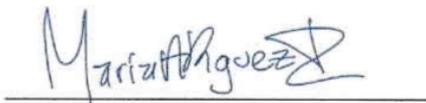
Dr. Julio César Tafolla Arellano

Asesor Principal



Dr. Edgar Omar Rueda Puente

Asesor principal externo



Dra. María Antonieta Rodríguez Ibarra



M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Noviembre, 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de Candelilla (*Euphorbia
antisyphilitica* Zucc.)

Por: Ernesto Juárez León

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría

Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal

Dr. Edgar Omar Rueda Puente
Asesor principal externo

Dra. María Antonieta Rodríguez Ibarra

M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Noviembre, 2024.

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

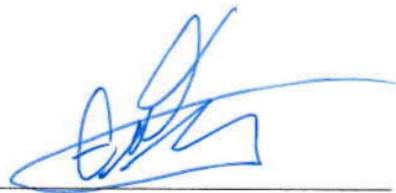
Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes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

A t e n t a m e n t e.

Alma Terra Mater

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, positioned above a thin horizontal line.

Ernesto Juárez León

Autor principal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por abrirme las puertas y por permitirme formar parte de su casa de estudios, convirtiéndose en mi segundo hogar. Gracias por todo lo aprendido y por todas las experiencias de mi *alma terra mater*

Agradezco al **Dr. Julio César Tafolla-Arellano** por darme la oportunidad de trabajar con él y más que nada por tenerme paciencia, durante mi estancia aprendí muchas cosas sobre lo cual, y sé que un futuro me puede servir, agradezco por todo el conocimiento que aprendí de durante este tiempo.

Agradezco al **M.C. Luis Bernardo Rincón López** por compartir su conocimiento conmigo y por ayudarme en este proyecto

Agradezco al **Dr. Edgar Omar Rueda Puente** por aportación durante este proyecto y por aceptar ser parte de mi comité de tesis.

Agradezco a la **Dra. María Antonieta Rodríguez Ibarra** por aportación durante este proyecto y por aceptar ser parte de mi comité de tesis

Agradezco a la **M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez** por aportación durante este proyecto y por aceptar ser parte de mi comité de tesis

Agradezco al **Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular** por abrirme las puertas y permitirme haber sido parte de su equipo de trabajo. Así como al proyecto UAAAN-38111-425405001-0162 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

DEDICATORIA

A **Jehová Dios**, por ser aquel que me ha permitido seguir con vida y seguir adelante, por ser mi guía y por ayudarme en situaciones difíciles. Gracias a él es que sigo de pie y por guiarme en el camino correcto

A mis padres **Silvestre Juárez Valencia** y **Paulina León Pérez** por su apoyo incondicional durante estos años de carrera, por tenerme demasiada paciencia y brindarme educación. Por ser un gran pilar en mi vida y guiarme en el camino correcto.

A mis hermanos **Jehu Juárez León**, **Braulio Juárez León** y **Usiel Juárez León** por todas las experiencias vividas durante todos estos años, porque son una pieza importante en mi vida.

A mis abuelas **Juana Valencia** y **Paula Pérez**⁺ por su cariño que me demostraron y por todo lo enseñado

A mis mascotas que se también que forman parte de mi familia **mamba** y **sugo** que, aunque no hablan me demuestran cariño de diferentes maneras y por ayudarme en días bajos.

A mis amigos de la carrera **Majo Covarrubias**, **Adrián Mederos**, **Adonis Ramírez** y **Diana Mercado** que hicieron de la carrera más amena y menos pesada.

A mis amigos **Karla Pérez**, **Rubén Gálvez**, **Saúl Altunar**, **Monce Jácome**, **Carolina Magdaleno** y **Vanessa López** por ser una pieza importante durante estos años y por todas las experiencias vividas.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Hipótesis	3
1.3 Objetivo General.....	3
1.3.1. Objetivos Específicos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades de la candelilla	4
2.1.1. Botánica	4
2.1.1.1 Taxonomía:	5
2.1.1.2. Morfología de la planta.....	5
2.1.1.3 Inflorescencia.....	6
2.1.1.4 Frutos	7
2.1.1.5 Semillas	7
2.1.1.7. Requerimientos edafoclimáticos.....	8
2.1.1.7.1. Clima	8
2.1.1.7.2. Temperatura.....	8
2.1.1.7.3. Tipo de suelo	8
2.1.1.7.4 Tipo de riego.....	9
2.1.1.7.5 Altura	9
2.1.1.6 Formas de reproducción	9
2.1.1.7 Formas de propagación.....	9
2.1.1.8 Hábitat	10
2.1.1.9 Distribución	10

2.2 Usos y funciones.....	11
2.3 Importancia de la candelilla.....	14
2.4. Extracción de la cera de candelilla	15
2.5 Comercialización de la cera de Candelilla	16
2.6. Amenazas	16
2.7. Biotecnología vegetal	16
2.7.3 Reguladores de crecimiento.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Material vegetal	22
3.1.1 Obtención del material vegetal	22
3.1.1.2 Selección de explantes.....	22
3.2.1 Desinfección de los tallos	23
3.3 Establecimiento	23
3.3.1 Medio de cultivo para establecimiento de las yemas y meristemos	23
3.3.2 Siembra de yemas y meristemos	24
3.4 Estrategia experimental	25
3.4.1 Tratamientos	25
3.5. Multiplicación <i>in vitro</i> por medio semisólido	25
3.5.1 Material vegetal	25
3.5.2 Toma de mediciones.....	19
3.5.3 Diseño Experimental	20
3.5.4 Análisis estadístico	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Multiplicación por el tratamiento T0 (Testigo)	22
4.2 Multiplicación del tratamiento uno (T1)	23
4.3 Multiplicación del tratamiento dos (T2).....	23
4.4 Multiplicación del tratamiento tres (T3).....	24
4.5 Multiplicación por el tratamiento cuatro (T4)	25
4.6 Análisis estadístico	25
V. CONCLUSIONES.....	29
VI. LITERATURA CITADA.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición medio Woody Plant.....	18
Cuadro 2. Composición medio Gresshoff & Doy	19
Cuadro 3. Etapas y tiempo de desinfección de los tallos	23
Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para el establecimiento.	24
Cuadro 3. Tratamientos Evaluados	18
Cuadro 6. comparación de medias mediante la prueba de Turkey de la evaluación de los tratamientos para la multiplicación en el sistema semisólido para la multiplicación <i>in vitro</i>	25
Cuadro 7. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable Longitud de planta.	26
Cuadro 8. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable ancho de tallo.....	26
Cuadro 9. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable número de raíces. 27	
Cuadro 10. Prueba de medias de Turkey de la evaluación de la variable número de entrenudos.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de Candelilla (<i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc.).....	6
Figura 2. Flores de candelilla.	6
Figura 3. Frutos de candelilla	7
Figura 4. Semillas de candelilla	7
Figura 5. Raíz de candelilla.....	8
Figura 6. Distribución de la candelilla	11
Con base en: Google Earth.....	11
Figura 7. Bálsamo limpiador nutritivo	12
Figura 8. Goma de mascar de la marca Clorets.....	13
Figura 9. Tradición de Higuera Nuevo León.....	15
Obtenido de: You Tube, Farytrips.....	15
Figura 11. Plantas madre de candelilla.....	22
Figura 12. Siembra de explantes de candelilla en medios de cultivo.....	22
Figura 13. Desinfección de explantes.....	23
Figura 14. Autoclave para esterilizar los medios de cultivo	24
Figura 15. Planta madre para la obtención de yemas axilares.....	25
Figura 16. Mediciones de candelilla.....	19
Figura 17. Mediciones de candelilla.....	19
Figura 18. Mediciones de la planta.....	20
Figura 19. Brotes de candelilla.....	21
Figura 20. Callos de candelilla	21
Figura 21. Raíces de candelilla.....	22
Figura 22. Explantes del tratamiento 0.....	22
Figura 23. Explantes del tratamiento 1.....	23
Figura 24. Explantes del tratamiento 1.	24
Figura 25. Explantes del tratamiento 4.	24
Figura 26. Explantes del tratamiento 3.	25
Figura 27. Evaluación de la variable longitud de planta.	26
Figura 28. Evaluación de la variable Ancho de tallo.	27

Figura 29. Evaluación de la variable Número de raíces..... 27

Figura 30. Evaluación de la variable número de entrenudos..... 28

RESUMEN

Euphorbia antisyphilitica Zucc., comúnmente conocida como candelilla es un valioso recurso natural no maderable ya que su cera es muy demanda en diferentes industrias. Esta especie ha sido explotada por más de cien años, lo que ha provocado una pérdida significativa de variabilidad genética y una reducción del germoplasma. Actualmente, la falta de un protocolo adecuado para la propagación *in vitro* ha limitado su multiplicación a gran escala, esencial para la restauración y conservación en zonas explotadas. El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes medios de cultivo y su efecto en la producción de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla con reguladores de crecimiento. Los tratamientos evaluados fueron: T0) sin reguladores de crecimiento y Murashige y Skoog (MS) Basal Salt Mixture, T1) MS + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA, T2) MS con vitaminas + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA, T3) con McCown's Woody Plant Basal Salt Mixture + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA y por último el T4) con Gresshoff & Doy Basal Medium + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA. Los datos obtenidos a los 53 días mostraron que el tratamiento T3 mostró mayor eficiencia en la producción de longitud (LP)= 42.29 ± 4.0 mm en comparación con T1, el cual mostró resultados medios de (LP)= 11.93 ± mm y ancho de planta (AT)= 2.25 ± 0.20 mm comparado con 2.11 ± 0.20 mm con T1, número de raíz (NR)= 4.2 ± 0.40 raíces contra 0.1 ± 0.01 raíces. Respecto a los entrenudos de (NE)=5.6 ± 0.40 mm contra 1.8 ± 0.01, longitud de (LC)= 11.262 ± 0.40 mm contra 3.79 ± 0.20 mm y ancho de callo (AC)=10.265 ± 0.3 mm comparado con 3.30 ± 0.10 mm. Los nutrimentos como nitrato de calcio, sulfato de potasio y sulfato de magnesio optimizaron el crecimiento de candelilla para la propagación *in vitro*.

Palabras clave: Candelilla, *Euphorbia antisyphilitica*, Reguladores de crecimiento. Sistema semisólido, Cultivo *In vitro*

I. INTRODUCCIÓN

Euphorbia antisiphilitica comúnmente conocida como candelilla, es un arbusto perenne del norte de México y sur de Estados Unidos de América. Es una especie que produce cera en la superficie del tallo, la cera evita que la planta pierda agua y energía (Flores-del Angel *et al.*, 2013). Es un arbusto con sus tallos cilíndricos, compactos y derechos, están cubiertos por cera, tienen hojas pequeñas y en épocas lluviosas florece. La candelilla es una especie endémica de zonas semidesérticas México, estados como Zacatecas, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Hidalgo, Durango, Chihuahua y Coahuila. En E.U.A se encuentra en los estados de Nuevo México y Texas (Molina *et al.*, 2011). La candelilla es un arbusto perenne y ramificado, puede medir hasta un metro de alto, tiene un sistema de tallos subterráneos (rizomas) lo cual hace que haya muchos tallos erectos, son cilíndricos con un grosor de 5 mm, son de color verde, gris o azulados. Cuenta con hojas, pero con muy pequeñas y solo por un periodo corto de tiempo (Rocha-Estrada *et al.*, 2021). Crece en climas semidesérticos, en laderas donde hay mucha concentración de calcio, o sea en suelos rocosos. Su raíz es muy pequeña, aunque la planta genera más de 100 tallos, el diámetro de los tallos es de 1-10 mm. En temporada de lluvias florece de color rosa pálido y son muy pequeñas (Instituto de Candelilla, 2013).

La cera de la candelilla es multiusos y cuenta con muchas aplicaciones en el sector industrial, es uno de las especies más importantes en los recursos forestales no maderables y que ha sido explotada durante más de 100 años, lo que representado un ingreso económico en las comunidades marginadas de las regiones (Rocha-Estrada *et al.*, 2021). México es el único país en producir cera de candelilla, además de que el 90 % es exportado a Alemania, Argentina, Colombia, España, Estados Unidos, Inglaterra, Italia, Irlanda y Japón (CONAFOR, 2021).

El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes medios de cultivo y su efecto en la producción de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.).

1.1 Justificación

Este proyecto está enfocado en el objetivo de la agenda ONU Vida y de ecosistemas terrestres, que se sustenta en proteger, restablecer y promover un uso sustentable de los ecosistemas terrestres, combatir contra la desertificación, parar e invertir la degradación de la tierra y, combatir y parar la pérdida de la biodiversidad y en el 15.5 que es: Adoptar medidas urgentes y significativas para reducir la degradación de los hábitats naturales, detener la pérdida de biodiversidad. La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) cuenta con una Norma Oficial Mexicana “NOM-018-RECNAT-2012” en la cual establece los procedimientos, criterios y especificaciones y administrativas para realizar el aprovechamiento sostenible de la hierba de candelilla, transporte y almacenamiento sostenible de la hierba de candelilla, transporte y almacenamiento del cerote. Al margen un sello con el Estado Unidos Mexicanos- Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT, 1999).

1.2 Hipótesis

"El uso de un medio enriquecido con nutrientes específicos (Nitrato de calcio, sulfato de potasio y sulfato de magnesio) inducirá mayor longitud y número de brotes en explantes de *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. durante su multiplicación *in vitro*"

1.3 Objetivo General

Evaluar diferentes medios de cultivo y su efecto en la producción de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.).

1.3.1. Objetivos Específicos

1.3.1.2 Evaluar el efecto de medio Murashige y Skoog Basal Salt Mixture en medio semisólido, el porcentaje de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

1.3.1.3 Evaluar el efecto de medio Murashige y Skoog Basal Salt Mixture + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA en medio semisólido, el porcentaje de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

1.3.1.4 Evaluar el efecto de medio Murashige y Skoog Basal Medium With Vitamins + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA en medio semisólido, el porcentaje de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

1.3.1.5 Evaluar el efecto de medio, McCown's, Woody Plant Basal + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA en medio semisólido, el porcentaje de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

1.3.1.6 Evaluar el efecto de medio Gresshoff & Doy Basal Medium with Vitamins + 1.5 mg/L⁻¹ de IAA y KIA en medio semisólido, el porcentaje de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de la candelilla

La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) se distingue por sus tallos cilíndricos de color verde, gris y azul con pequeñas hojas, cuando son épocas lluviosas brotan unas flores en color rosadas. La candelilla esta químicamente compuesta de carbohidratos estructurales por celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, cera y extracto hidrosoluble, todos estos componentes son esenciales para el aprovechamiento integral, lo con lleva a la producción de enzimas hidrolíticas y obtener antioxidantes como la catequina, ácido elágico y taninos hidrolizables (Núñez *et al.*, 2022). La candelilla se clasifica a la familia *Euphorbiaceae*, se forma de árboles, arbustos y herbáceas con látex, esta es una especie endémica del norte y en zonas semidesérticas como: Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Durango, Nuevo León, Puebla, Oaxaca, Tamaulipas, San Luis Potosí y Zacatecas.

México es el único país donde se explota la candelilla para la obtención de su cera, con aplicaciones en el sector farmacéutico, alimentario y cosmético. La candelilla ha ayudado a la actividad económica a las comunidades rurales, por es muy importante investigar sobre su conservación y producción sustentable (CONABIO, 2022).

La candelilla se encuentra en zonas semiáridas de México, la cera es un recurso no maderable valioso. Su producción comenzó a mediados de 1900 en regiones que se les nombraron candelilleras. A más de 100 años de la producción de la cera de candelilla, ha dado sustento económico a más de 35, 500 productores que se distribuyen en 230 ejidos, de 33 municipios del norte de nuestro país (CONAFOR, 2021)

La candelilla ha disminuido considerablemente su germoplasma, uno de los motivos es porque se arranca con todo y raíz, por eso es muy importante en el desarrollo de nuevas estrategias de manejo para que podamos conservar la candelilla en su ambiente natural y ser autosustentables en la producción y explotación de la cera (Granillo *et al.*, 2017).

2.1.1. Botánica

En el año de 1829 el botánico J.G. Zuccarini describió a dicha planta con el nombre científico de *Euphorbia antisyphilitica*,

Más tarde surgió una nueva clasificación por G. Alcocer nombrándola como *Euphorbia cerífera* ya que era una planta que produce cera, que sirve como protección y retención de agua (Instituto de Candelilla, 2013).

2.1.1.1 Taxonomía:

Reino: *Plantae*

Filo: *Tracheophyta*

Clase: *Equisetopsida*

Orden: *Malpighiales*

Familia: *Euphorbiaceae*

Subfamilia: *Euphorbiaceae*

Tribu: *Euphorbiaceae*

Subtribu: *Euphorbiinae*

Género: *Euphorbia*

Especie: *Euphorbia antisiphilitica*

2.1.1.2. Morfología de la planta

Euphorbia antisiphilitica Zucc., mejor conocida como candelilla es una planta perenne de muchos tallos cilíndricos, que varía el color de acuerdo a su ciclo de vida. Van colores desde verde blanquecino, azul o gris. Los tallos son herbáceos, erectos y sin ramificaciones, la altura varía de acuerdo a su maduración llegando a un promedio de 45 a 65 cm y en su etapa tierna es de 5 a 10 centímetros, hay registros de especies con altura de 120 cm. El diámetro de la candelilla en su etapa madura va de 0.3 a 0.5 cm. La raíz es de color verde con gris o de color café rojizo, la raíz está cubierta de una capa semileñosa y con mucho látex. Las hojas de la candelilla son espaciadas, pequeñas y sésiles de color verde oscuro, las podemos encontrar de forma alternas, verticiladas u opuestas (CONABIO, 2022)



Figura 1. Planta de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.)

2.1.1.3 Inflorescencia

Las flores de la candelilla son muy pequeñas y únicamente se ve en época lluviosa, llegan a medir 5 milímetros de diámetro, su pedúnculo es corto, en la parte de la base presenta dos brácteas aguadas. Su corona es dialipétala y tienen unos abultamientos que son como una especie de glandulas hemisféricas de un tono más fuerte. En si las flores llegan hacer de colores rosa pálido y un rosa rosado (Ramírez, 2022)



Figura 2. Flores de candelilla.

2.1.1.4 Frutos

Los frutos los podemos encontrar de tonalidades verdes, cafés y rojos, el fruto llega a medir de 3 a 4 milímetros de diámetro. Cuando el fruto madura se observa de color café con tonalidades ya mencionadas. Cuando la capsula llega a su etapa de maduración esta explota, de esta manera se esparce por toda la planta y de tal manera las semillas se expanden y surgen nuevas plantas de candelilla (Montalvo, 2019).



Figura 3. Frutos de candelilla

2.1.1.5 Semillas

Sus semillas son de color café claro, son de estructura delgada con color blanco, tienen mucho endospermo. La propagación de la semilla es muy difícil por su tamaño y fenología. Se estima que aproximadamente un kilo tiene 272,000 semillas de las cuales el 90% es útil para propagar (Ávila, 2007).



Figura 4. Semillas de candelilla

2.1.1.6 Raíz

Es una planta con raíz muy pequeña, de color blanco y café, es muy fácil arrancarlas del suelo. La raíz es no produce cera y es la causante de impurezas sólidas en su producción, es recomendable cortar solo los tallos a la altura del suelo (Rocha-Estrada *et al.*, 2021)



Figura 5. Raíz de candelilla

2.1.1.7. Requerimientos edafoclimáticos

2.1.1.7.1. Clima

Es una planta que normalmente se encuentra en zonas de matorral xerófilo y crece en climas desérticos. Para protegerse de los rayos del sol, la candelilla produce una cera, ayudándola a las condiciones extremas de su hábitat (CONAFOR, 2019).

2.1.1.7.2. Temperatura

Soporta temperaturas extremas de hasta 43 grados Celsius en el verano y cuando es invierno soporta temperaturas bajas de -10 grados Celsius.

2.1.1.7.3. Tipo de suelo

Crece en laderas en suelos calcáreos, y con materiales rocosos, son de origen aluvial y someros, tienen profundidad que menor a 25 cm, con textura arenosa, con poca profundidad, pedregosos (con mucha piedra), tienen que tener buen drenaje, abundantes en

carbonato de calcio y pobres en nitrógeno. El suelo debe de estar en un pH de 7.4 a 8.4 o sea un pH ácido (Montalvo, 2019)

2.1.1.7.4 Tipo de riego

Al ser una planta que es de clima semidesértico la candelilla requiere muy poca precipitación, ya que cuando hay un exceso de agua conlleva a que la raíz se pudra y muera. Lo que si requiere es que haya una gran exposición a los rayos del sol (Plantiago, 2024).

2.1.1.7.5 Altura

Es una planta que se adapta a zonas semidesérticas y por lo tanto se han reportado avistamientos que se encuentran entre los 460 a 2400 metros sobre el nivel del mar CONAFOR, (2021) & (Inventario Nacional Forestal, 2008, citado en citas, 2009).

2.1.1.6 Formas de reproducción

Han reportado que la reproducción de la candelilla se presenta de dos formas, sexual y asexual, la reproducción sexual está ligada gracias a la humedad que hay durante la floración, en los meses de febrero a julio.

2.1.1.7 Formas de propagación

Por medio de tallos subterráneos (rizomas), la propagación mediante estacas puede ser la más viable y la reproducción de hijuelos consiste en un largo periodo de lluvias (López, 2007)

2.1.1.7.1 Reproducción por hijuelos

La reproducción por hijuelos consiste en obtener plantas de candelilla y dejarlas en un lugar lejos de sol. Posteriormente se seleccionan los hijuelos que se estén bien y sanos, con un tamaño de 15 centímetros de longitud. Después se dejan remojar en Captan (un gramo por un litro de agua). El sustrato que se ha usado es la mezcla de arena de río y turba. Se ha reportado el uso de suelos arenosos, como la arena de río y turba para aumentar la porosidad del sustrato y haya aireación y mucha retención de agua. El sustrato debe regarse en las primeras semanas de germinación, procurando ser un riego ligero (López, 2007).

2.1.1.7.2 Propagación por estacas

Se recomienda el uso de plantas con raíces en buen estado y vigorosas. El uso de casa sombra durante los primeros días es de relevancia para después establecerlas en invernadero donde se usan tallos de 20 centímetros. En la parte superior del tallo se usa vaselina para cerrar heridas y el uso de fungicidas como el captan, a una solución de 1 gramo por litro de agua, el captan ayuda a que no haya pudrición de las raíces. Después se plantan cuatro tallos en cada maceta o bolsa y posteriormente regarlas. El regándolas tres veces por semana (Villa-Castorena *et al.*, 2010)

2.1.1.7.3 Propagación por semillas

La recolección de semillas es muy complicada ya que cuando en el fruto revienta las semillas se esparcen en cualquier lugar. Una vez que se recogieron, se debe vaciar en recipientes de plástico y vidrio, estos deben no dejar pasar la luz y se conserva a temperaturas de 24 a 26 grados Celsius. Después se deben seleccionar las semillas buenas y de las vanas. La siembra consiste en charolas de poliuretano, en bolsas de plástico y vasos de poliuretano. El sustrato usado es turba con perlita, el cual se debe humedecer. Como último paso es necesario tapar los recipientes con una bolsa transparente en un lugar sombreado (Castorena *et al.*, 2008)

2.1.1.8 Hábitat

La candelilla crece en las zonas áridas de México y en los matorrales desérticos rosetófilo de lo cual deben de contar con buen drenaje. La precipitación pluvial promedio es menor a 300 mm al año. Las temperaturas medias al año son de 18 a 22 grados Celsius. Es resistente a temperaturas extremas de 47 grados Celsius y temperaturas mínimas de 12 grados Celsius. La candelilla se encuentra en altitudes de 250 a 1450 metros sobre el nivel del mar (Rocha-Estrada *et al.*, 2021)

2.1.1.9 Distribución

La candelilla es una planta endémica de las zonas semidesérticas y se encuentran estados como Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Durango, Nuevo León, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. En Estados Unidos de Texas y Nuevo México (Molina *et al.*, 2011)

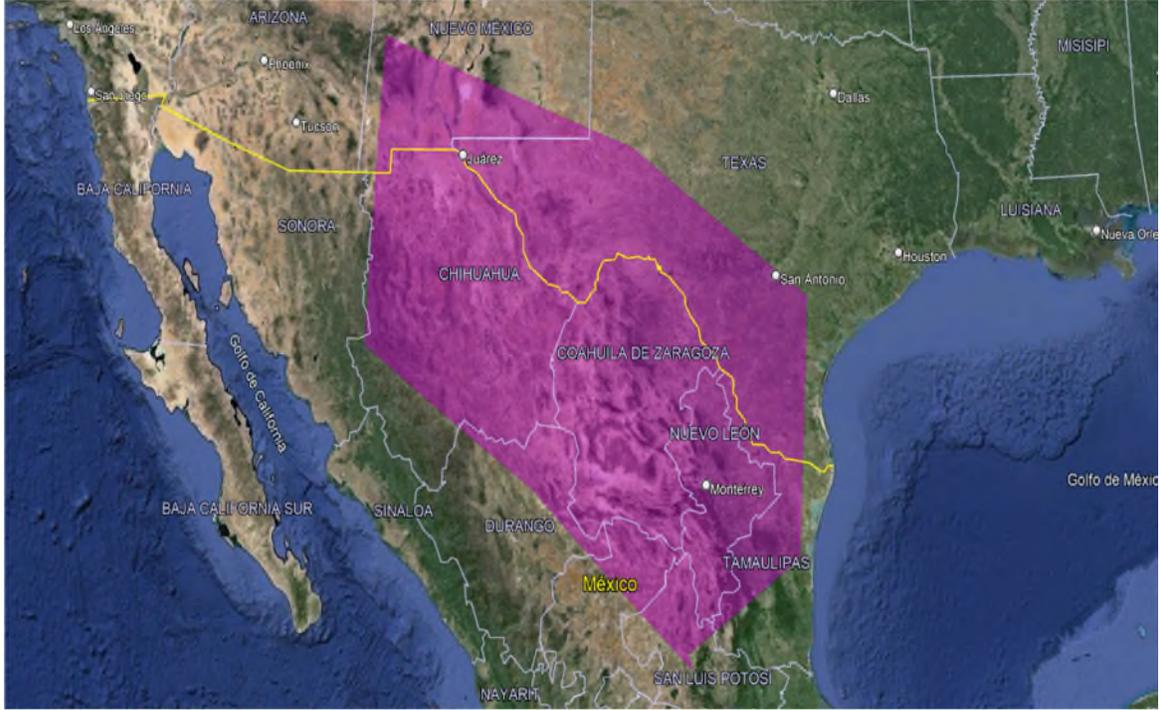


Figura 6. Distribución de la candelilla

Con base en: Google Earth

2.2 Usos y funciones

La candelilla se usa desde la colonización española, la cera de la candelilla la usaban para la fabricación de velas. La característica fisicoquímica de esta planta ha arrasado con industrias nacionales e internacionales, ya que la cera es muy valiosa para la fabricación de muchos productos. Hoy en día la candelilla es una de las especies con unos de los recursos más importantes del noreste del país (CONABIO, 2008)

2.2.1 Industria cosmética y skin care

Se usa como un agente formador de películas y como emoliente. La cera de candelilla es un producto natural y eso se ha convertido en una gran demanda del producto. El rímel es el cosmético más usado, seguido del lápiz labial y lápiz cosmético. También la barra delineadores de ojos y sombras de parpados son cosméticos con cera de candelilla. La función de la cera de candelilla en los cosméticos estabiliza el producto cuando hay cambios de temperatura y alarga su vida útil también sin alterarlo químicamente (Cabello-Alvarado *et*

al., 2013). Por sus grandes propiedades protectoras, la cera es aplicada para enriquecer y nutrir productos que van destinados al cuidado de la piel, productos como: bálsamos para los labios, cremas corporales para pieles agrietadas o secas además de shampoo y cremas para el cabello (Mioranza, 2022)



Figura 7. Bálsamo limpiador nutritivo

Disponible en: Sâper

2.2.1 Industria alimentaria

La cera de la candelilla ha sido uno de los hidrocarburos más usados en productos. Con el avance y el desarrollo de metodologías se han elaborado películas comestibles. Las películas comestibles evitan la pérdida de peso, contenido de sólidos, les da firmeza, cambios de pH y a la actividad acuosa de diferentes frutas. Otra de funciones la cera es que ha logrado alargar la vida de anaquel (Rojas-Molina *et al.*, 2011). También se ha usado como anticoagulantes, agente de carga, emulsificante y agente de recubrimiento.

La cera de la candelilla tiene diversas aplicaciones como ha sido reportado por Alvarado *et al.* (2013) la podemos encontrar en alimentos como:

- Bebidas azucaradas artificiales y bebidas aromatizadas a base de agua como bebidas electrolíticas y sueros.
- Café, substitutos de café, tés, infusiones de hierbas. Cereales y bebidas que contengan mucho contenido de cacao
- Chicles

- Decoraciones, ya sea en pasteles o galletas
- Dulces y turrone
- Panadería
- Productos de imitación de chocolate



Figura 8. Goma de mascar de la marca Clorets

2.2.2 Industria farmacéutica

Los indígenas reconocían a esta planta gracias a las propiedades que tiene ya que esta era utilizada para tratar la enfermedad de transmisión sexual “sífilis”. Hoy en la actualidad existen otros tratamientos para erradicar la enfermedad (Instituto de la candelilla, 2013). También es un excelente compuesto desinfectante para las manos por su formulación balanceada permite un grado de desinfección permite la eliminación de hongos, bacterias, esporas, etc.

2.2.3 Industria electrónica

Se ha utilizado como circuitos integrados y circuitos integrados (SMA, 2021)

2.2.4 Industria textil

Se mezcla con otros tipos de ceras vegetales y se usan en acabados para textiles y cordones (SMA, 2021)

2.3 Importancia de la candelilla

Es un valioso recurso no maderable, es una planta endémica de México, o además en una de las pocas plantas con una gran cantidad de hidrocarburos, la cera obtenida es de muy buena calidad y con gran producción. Un dato interesante es que la cera que se produce en México es exportada con un total del 90% (CONAFOR, 2021). La candelilla es un recurso importante para el noreste de México, como para productores locales, industrias del país y el mundo. Se estima que 20,000 campesinos en los 229 ejidos en la zona noreste del país producen la cera de candelilla. Para producir de cinco a seis kilos de cera se necesitan cuatro días de arduo trabajo (Maycotte-de la Peña *et al.*, 2021)

2.3.1 Importancia socioeconómica

Gracias a las características físicas y químicas de la cera de la candelilla, ha logrado ganarse el mercado nacional e internacional. Los estados con mayor producción de cera son Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León y Zacatecas con un área de 350 000 km² y producen un total de 3 millones de toneladas, lo más importante es que beneficia a 21 000 familias. Coahuila es el estado con más producción de cera con 1494 toneladas, seguido de Chihuahua con 215 000 toneladas, en tercer lugar, es Durango con 210 000 toneladas y por último Zacatecas con 108 000 toneladas (Ramírez, 2005). En Higuera Nuevo León los días 11 y 12 de diciembre se celebra una tradición la cual consiste en una misa y posteriormente en una danza compuesta solo por mujeres llamadas “matachines” y por último el padre de la iglesia junto con otros hombres quemar pilas de candelilla (México desconocido, 2013).



Figura 9. Tradición de Higuera Nuevo León

Obtenido de: You Tube, Farytrips

2.3.2 Importancia ecológica

Al ser un arbusto la candelilla evita a que la tierra se erosione, ya que protege al suelo de los rayos del sol y del efecto del viento, contribuye a que otras plantas crezcan y se mantengan, plantas como: pasto chino, sotol, lechuguillas y varios cactus. No hay registro de que a la candelilla tenga alguna enfermedad, plaga u hongo (CONABIO, 2008).

2.4. Extracción de la cera de candelilla

El proceso tradicional de la cera es el siguiente, la planta se vacía en unos calderos de hierro (pialas) y se le agrega ácido sulfúrico con una concentración de 0.3% (v/v), lo cual no es un proceso seguro tanto para el productor y el ambiente. Se usa alrededor de una brazada que son entre 24 a 32 kilogramos de material vegetal. La paila debe tener la capacidad de 500 litros. La solución de agua más el ácido debe ponerse al fuego directo, debe de llegar a ebullición, el propósito es que la cera pueda desprenderse de la planta. La cera sube a la parte superior del recipiente y se observa de color crema o amarillo, después la cera es retirada con espumaderas se debe enfriar hasta solidificarse. Después se quiebra la cera con un martillo o algo duro. Los trozos se vacían en recipiente de fierros con la misma solución del ácido sulfúrico, con el propósito de que quitar impurezas y material orgánico. Al final se separan por sedimentación (Martínez, 2013).

2.5 Comercialización de la cera de Candelilla

La candelilla es una de las pocas plantas con un valioso recurso natural no maderable, ha sido utilizada principalmente en maquillaje y belleza. La cera es de muy buena calidad y ha generado respuestas positivas en el comercio internacional lo cual más del 90 % de la cera es exportada a países como: Argentina, Colombia, Italia, Irlanda, Inglaterra, Holanda, Francia, España, Alemania, Japón y siendo Estados Unidos el país con más exportaciones. Gracias a la cera de candelilla y por más de 100 años ha bonificado a más de 3,500 productores que se distribuyen en 230 ejidos, en 33 municipios de México (CONAFOR, 2021).

2.6. Amenazas

Por la enorme variedad que tiene la candelilla, las industrias han logrado que la candelilla se ha apreciada por muchos pobladores y agricultores. Siendo México el único país en el mundo en producir su cera que gran parte es exportada. Es muy importante cumplir las legislaciones nacionales de acuerdo con la NOM-055-SEMARNAT-2012 (Instituto de Candelilla, 2013). Uno de los problemas ecológicos es que los productores siguen usando ácido sulfúrico para que la cera se desprenda de la planta y posteriormente la cera es vendida a refinadoras industriales. Uno de los grandes problemas es que el ácido sulfúrico es muy corrosivo, dañando el ecosistema. Otro problema surge cuando los agricultores arrancan la planta desde la raíz y no dejan ejemplares, de esa manera afecta que se regenere la planta y posiblemente muera. El sector pecuario es otra amenaza ya que se deforestan hectáreas donde hay ejemplares de candelilla también hay problemas con los incendios y el pastoreo de ganado (Sofía de Teresa, 2014)

2.7. Biotecnología vegetal

La biotecnología vegetal es un ciencia para las investigaciones de científicos aunque hoy en día hay una gran debate sobre las modificaciones genéticas de algunos organismos (CONICET, 2011). La biotecnología vegetal engloba una variedad de técnicas para de cultivos de células vegetales para su posterior clonación de y las transformaciones genéticas, la técnica de ARN recombinante permiten las construcciones genéticas y cuando hay un gen de interés los marcadores moleculares marcan para estudiar su caracterización y filogenia (Perera *et al.*, 2010)

2.7.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales implica técnicas de interés algunas de los objetivos es proteger especies en peligro y proteger su subsistencia, una de las metas logradas son los recursos o la búsqueda de algún compuesto de interés. La técnica de cultivo vegetales se basa en la totipotencialidad de las células vegetales para originar un nuevo organismo por el cultivo *in vitro* en un ambiente de asepsia con la ayuda de reguladores de crecimiento y retardadores de crecimiento que retardan el tiempo de maduración de la planta, de esa forma se obtiene en menor tiempo al de su vida silvestre (Morales *et al.*, 2016).

También se puede definir como un grupo heterogéneo con técnicas que a partir de algún explante (donde hay órganos, tejidos, células y protoplastos). Se cultiva asépticamente en medios artificiales en condiciones ambientales controladas. Podemos encontrar dos formas de medios artificiales que son los semisólidos y el medio líquido. Es muy importantes contar con aspectos de asepsia o sea un ambiente estéril, aspectos relacionados a la planta y sobre todo las condiciones de temperatura y pH (Vela *et al.*, 2024).

2.7.2 Medio de cultivos

El medio de cultivo se conforma de mezclar vitaminas, sales minerales, azúcar, reguladores de crecimiento, agar y agua, cada medio se compone de acuerdo a la especie vegetal y a la etapa del proceso de micropropagación (Suárez, 2020). Las células requieren muchos nutrimentos orgánicos e inorgánicos: macronutrientes y micronutrientes. La preparación de un medio de cultivo es darles las condiciones a las plantas como si estuvieran en su ecosistema silvestre (Krikorian, 1991).

2.7.2.1 Medio Woody Plant

El medio de cultivo Woody Plant (WPM) fue formulado por Lloyd y McCown (1981). Esta formulación específica fue diseñada para promover el crecimiento y desarrollo de plantas leñosas como árboles y arbustos FAO, (1989); CAR (1990). Este medio está compuesto por una mezcla de ingredientes cuidadosamente seleccionados que proporcionan los nutrientes y la estructura necesarios para el enraizamiento y el establecimiento de las plantas, el nitrato de potasio se eliminó de este medio y se reemplazó con sulfato de potasio, los niveles de

nitrate de amonio son un cuarto en comparación con Murashige Skoog, (1962) MS Y el nitrógeno también lo proporciona el nitrate de calcio Lloyd y McCown (1981).

Cuadro 1. Composición medio Woody Plant

COMPUESTO	Formula (mg/L)
Nitrato de amonio	400
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio	72.5
Nitrato de calcio	386
Sulfato cúprico penta-hidratado	0.25
EDTA	37.3
Sulfato Ferroso hepta-hidratado	27.85
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato manganoso	22.3
Ácido Molíbico di-hidratado	0.25
Fosfato de potasio monobásico	170
Sulfato de potasio	990
Sulfato de zing hepta-hidratado	8.6
Glycina	2
myo-Inositol	100
Ácido Nicótico	0.5
Pyridoxina•HCl	0.5

2.7.2.2 Medio Gresshoff & Doy

Este medio ha sido reportado para el cultivo de especies de plantas como la Vid, Arabidopsis, tomate y cebada Gresshoff & Doy, (1974); *Trifolium repens* (Gresshoff, 1980). Este medio se desarrolló originalmente para el crecimiento de callos haploides y plantas a partir de anteras de *Vitis vinifera*. Las anteras cultivadas en la profase tardía de la meiosis dieron los mejores resultados para el desarrollo de plántulas haploides y especialmente para promover el crecimiento y desarrollo de ciertas especies vegetales bajo condiciones de laboratorio (Gresshoff & Doy, 1974). Algunos compuestos incluidos como el magnesio, oligoelementos como hierro zinc y manganeso, nitrógeno son aptos para el estudio de simbiosis en leguminosas, en los que se investigan la interacciones entre las raíces de la planta y bacterias fijadoras de nitrógeno, como el género *Rhizobium*.

Composición: macro elementos: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , KI , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, micro elementos: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

Ca(NO₃)₂·2H₂O, KH₂PO₄, KNO₃, MgSO₄, NH₄NO₃, además de contener vitaminas y reguladores de crecimiento.

El medio Gresshoff & Doy es aplicado para la formación de nódulos en especies leguminosas permitiendo que las plantas generen simbiosis con bacterias, esto por su baja concentración de nitrógeno en comparación con otros medios de cultivo. Esta aplicación es utilizada para la investigación de mecanismos de fijación de nitrógeno y desarrollar cultivos con menores requerimientos de fertilizantes nitrogenados (Andrews y Hammatt, 2002).

Cuadro 2. Composición medio Gresshoff & Doy

COMPUESTO	Formula (mg/L)
Nitrato de amonio	1000
Ácido bórico	0.3
Nitrato de calcio	241.2
Cloruro de cobalto·6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico·5H ₂ O	0.025
EDTA·2H ₂ O	37.25
Sulfato ferroso·7H ₂ O	27.85
Sulfato de Magnesio	17.1
Sulfato manganeso·H ₂ O	1
Ácido molíbico·2H ₂ O	0.025
Cloruro de potasio	65
Yoduro de potasio	0.8
Nitrato de potasio	1000
Fosfato de potasio monobásico	300
Sulfato de Zing·7H ₂ O	0.3
Biotina	0.2
Glycina	4
myo-Inositol	10
Ácido Nicótico (Free Acid)	0.1
Pyridoxina·HCl	0.1
Thiamina·HCl	1

2.7.2.1 Macroelementos

Los elementos que tienen funciones específicas y que son esenciales en el cultivo *in vitro* de las plantas se clasifican de acuerdo a la concentración que hay en las plantas y de acuerdo a los requerimientos conforme a su crecimiento (Kyrkby & Römheld, 2008).

Los macronutrientes se necesitan en grandes cantidades, aunque hay excepciones en algunos cultivos, son componentes de las proteínas, clorofila y ácidos nucleicos. Son requeridos en procesos de transformación de energía, a que se mantenga la presión interna de la planta y en la función enzimática (Salamanca & Baquero, 2006). Se deben incluir macroelementos que son los siguientes: Magnesio, Calcio, Azufre, Nitrógeno, Potasio y Fosforo (Krikorian, 1995).

2.7.2.2 Microelementos

Los micronutrientes se necesitan en pocas cantidades ya que son insuficientes, pero cuando están ausentes dando lugar a carencia, cuando hay un exceso de micronutrientes de una manera hay una toxicidad y como consecuencia daña a la planta (Polo *et al.*, 2016). Tienen funciones en el metabolismo de las plantas y tienen elementos que constituyen las enzimas (Salamanca & Baquero, 2006). También en el medio de cultivo se le agregan microelementos como: Cloro, Hierro, Molibdeno, Cobre, Magnesio, Zinc y Boro (Krikorian, 1995).

2.7.3 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son moléculas pequeñas con diferente función química, tienen funciones diferentes como des controlar su crecimiento y a regular el desarrollo de la planta (Chávez *et al.*, 2012). Los reguladores de crecimiento se clasifican de acuerdo la actividad del nivel vegetal, estructura de sus moléculas y a los efectos que pueden ser estimulantes o inhibidores. Algunas clasificaciones de hormonas vegetativas más populares son las auxinas, giberelinas y citoquininas (Burraco, 2005).

2.7.3.1 Auxinas

Son hormonas vegetales presentes en la naturaleza, tienen la función del crecimiento y su desarrollo del explante. Una de las formas más populares es el ácido indolacético (IAA), está presente en concentraciones nanomolares. Podemos encontrarlas en el mercado como son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA, ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA), hormonas presentes en la naturaleza y usadas en cultivo *in vitro* (Jordán & Casaretto, 2006).

2.7.3.2 Giberelinas

Las giberelinas con las hormonas más numerosas vegetales. La hormona más conocida es la del grupo GA3 (ácido giberélico).

La función de estas hormonas es estimular la división celular a la enlogación de los tallos, estimulan la germinación de semillas y estimulan la producción de de la enzima α -amilasa. También se encuentra como GA1 y GA2 (Lluna, 2006)

2.7.3.3 Citoquininas

Las citocininas son hormonas derivadas de la adenina, tienen la capacidad de estimular la proliferación y división celular, inducen la iniciación y elongación de las raíces. Permiten el desarrollo fotomorfogénico vegetal y aumentan y generan la producción de brotes a nivel vegetal, las formas populares las encontramos como la Kinetina, Zeatina, Benciladenina. 6-bencilaminopurina y 4- hidroxifeniletil (Amador-Alfárez *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

3.1.1 Obtención del material vegetal

Se obtuvo material vegetal de candelilla del ejido de San Jeronimo, Zacatecas a partir de una planta madre que se utilizó para el establecimiento *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.



Figura 11. Plantas madre de candelilla.

3.1.1.2 Selección de explantes

Se seleccionaron yemas axilares y meristemos apicales para el establecimiento de explantes en medio de cultivo Murashigue y skoog (MS 1X) acorde a lo reportado por Bernadac, 2022.

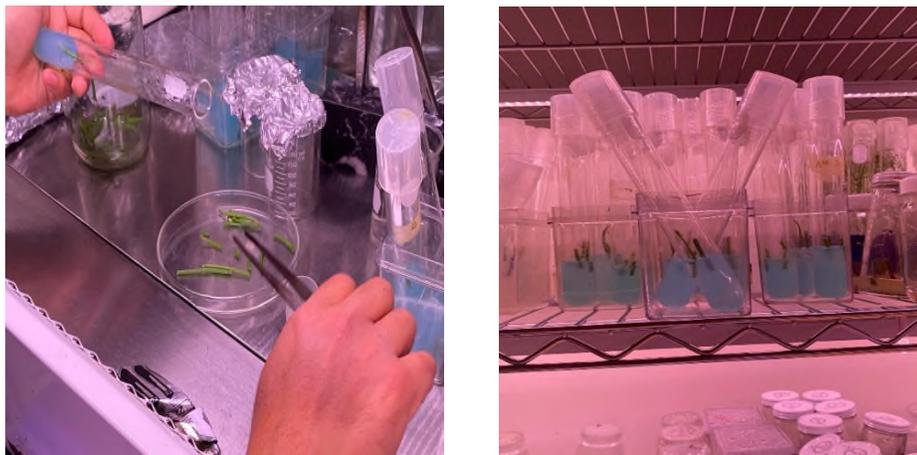


Figura 12. Siembra de explantes de candelilla en medios de cultivo

3.2.1 Desinfección de los tallos

Para la obtención de los explantes (yemas axilares y meristemos apicales) se lavaron con jabón comercial durante 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada. Después se realizó la desinfección en campana de flujo laminar con captan, cloro y alcohol como lo indica el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Etapas y tiempo de desinfección de los tallos

Compuesto	Tiempo
Captan ($1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	15 minutos
Alcohol (70 %)	10 minutos
Cloro (25 %)	5 minutos

*Gramos por litro ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)



Figura 13. Desinfección de explantes

3.3 Establecimiento

3.3.1 Medio de cultivo para establecimiento de las yemas y meristemos

Se preparó medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS 1X) con un pH de 5.7 en tubos de ensayo acorde a lo reportado por Bernadac, 2022.

Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para el establecimiento.

Compuesto	Cantidad
Murashigue y Skoog (CAS1912-24-9)	4.5 g. L ⁻¹
Sacarosa (CAS 87-89-8)	30 g. L ⁻¹
Myo-inositol (CAS 87-89-8)	0.1 g. L ⁻¹
Plant Preservation Mixture	0.1 µl g. L ⁻¹
Agar (CAS 9002-18-0)	7.5 g. L ⁻¹
Azul de metileno	1 mg L ⁻¹

*Gramos por litro (g. L⁻¹) Microlitros de muestra por litro (µl . L⁻¹).

La esterilización del medio de cultivo se realizó en el autoclave de la marca Novatech modelo EV-30, con presión de 120 °C y 20 PSI durante 20 minutos.



Figura 14. Autoclave para esterilizar los medios de cultivo

3.3.2 Siembra de yemas y meristemas

Se sembraron yemas axilares y meristemas apicales con una media de 3 a 5 centímetros en tubos de ensayo y se incubaron a 24 °C ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

3.4 Estrategia experimental

3.4.1 Tratamientos

Se evaluaron 4 tratamientos y un testigo con 10 repeticiones por cada tratamiento en medio semisólido. Se tomaron yemas axilares de las plantas propagadas con un largo de 1 a 1.5 centímetros de la parte del establecimiento

3.5. Multiplicación *in vitro* por medio semisólido

3.5.1 Material vegetal

El material vegetal de candelilla utilizado fue de las plantas madre establecidas en condiciones *in vitro* en el laboratorio

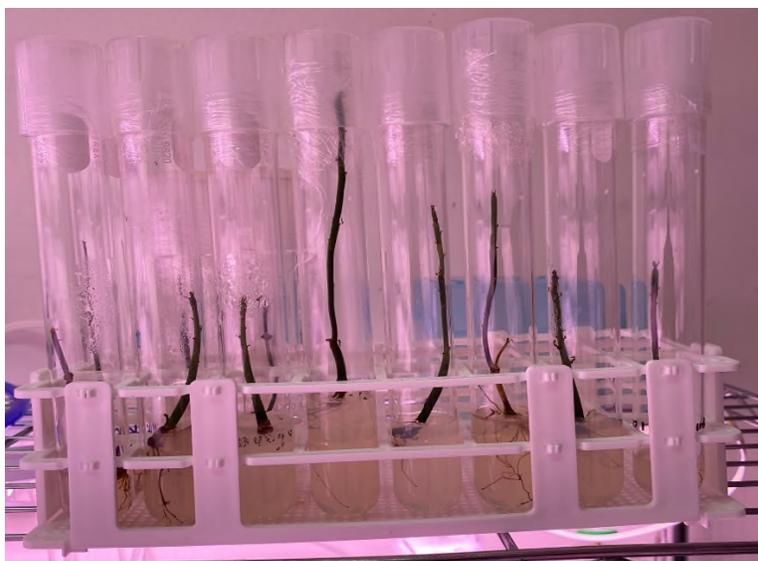


Figura 15. Planta madre para la obtención de yemas axilares

Se tomaron como referencia tratamientos reportados en candelilla, el medio de cultivo para los 5 tratamientos, se describen en el **Cuadro 4**.

Cuadro 5. Tratamientos Evaluados

COMPUESTO	TESTIGO	T1	T2	T3	T4
Murashige y Skoog Basal Salt Mixture	4.5 g. L ⁻¹	-----	-----	-----	
Murashige y Skoog Basal Salt Mixture	-----	4.5 g. L ⁻¹	-----	-----	
Murashige y Skoog Basal Medium with vitamins	-----	-----	4.43 g. L ⁻¹	-----	
McCown's Woody Plant Basal Salt Mixture	-----	-----	-----	2.3 g. L ⁻¹	
Gresshoff & Doy Basal Medium					2.71 g. L ⁻¹
Sacarosa (CAS 57-50-1)	30 g. L ⁻¹	30 g. L ⁻¹	30 g. L ⁻¹	30 g. L ⁻¹	30 g. L ⁻¹
Myo-inositol (CAS 87-89-8)	0.1 g. L ⁻¹	0.1 g. L ⁻¹	0.1 g. L ⁻¹	0.1 g. L ⁻¹	0.1 g. L ⁻¹
Plant Preservation Mixture Reguladores de crecimiento	2% -----	2% IAA (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	2% IAA (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	2% IAA (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	2% IAA (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹
Reguladores de crecimiento	-----	KIN (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	KIN (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	KIN (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹	KIN (CAS 87-51-4) 0.3 g. L ⁻¹

*Gramos por litro (g. L⁻¹), 3-Indoleacetic Acid (IAA), Microlitros de muestra por litro (μl . L⁻¹)

3.5.2 Toma de mediciones

Se realizó medición de longitud y ancho del explante, número de raíces, número de entrenudos, longitud del callo y ancho del callo.

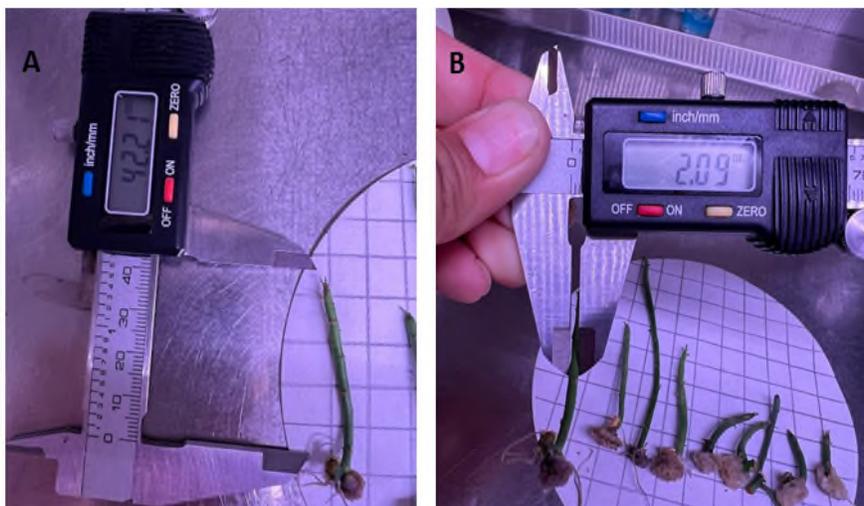


Figura 16. Mediciones de candelilla

*a) Longitud de la planta; b) Ancho de la planta



Figura 17. Mediciones de candelilla

*a) Numero de raíces en la planta; b) Número de entrenudos en la planta

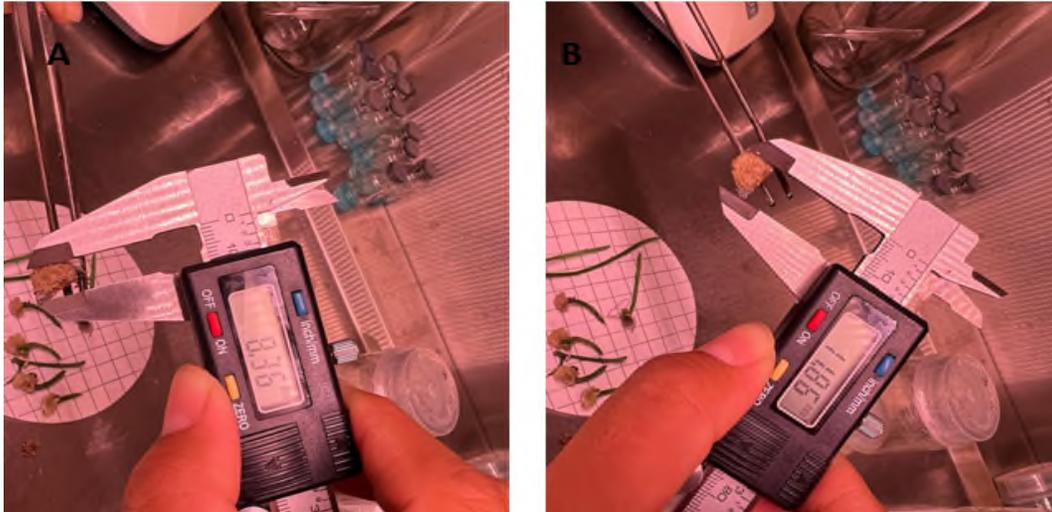


Figura 18. Mediciones de la planta

*a) Longitud del callo; b) ancho del callo

3.5.3 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con un ANOVA ($\alpha \pm 0.05$) con 10 réplicas biológicas por tratamiento. Los datos fueron evaluados a los 53 días después de la siembra.

3.5.4 Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey($\alpha=0.05$), utilizando el paquete estadístico STATISTICA 10 (StatSoft, 2014).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros brotes se observaron a los 6 días en los tratamientos T1, T3 y T4 (Figura 19).

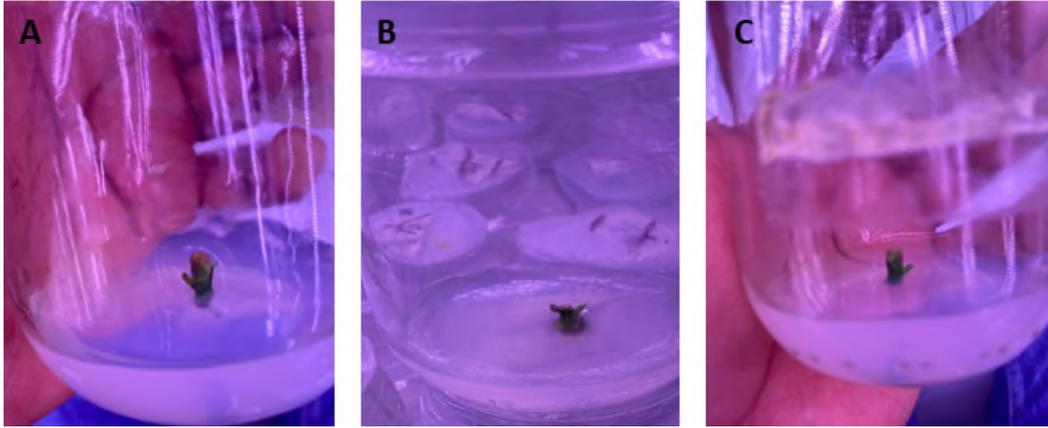


Figura 19. Brotes de candelilla

*a) Brotes en el tratamiento T1; b) Brotes en el tratamiento T3; c) Brotes en el tratamiento T4

La inducción de calogénesis se observó a los 15 días de incubación en los tratamientos T1, T2, T3 lo cual concuerda con lo reportado por Bernadac, (2022) (Figura 20).

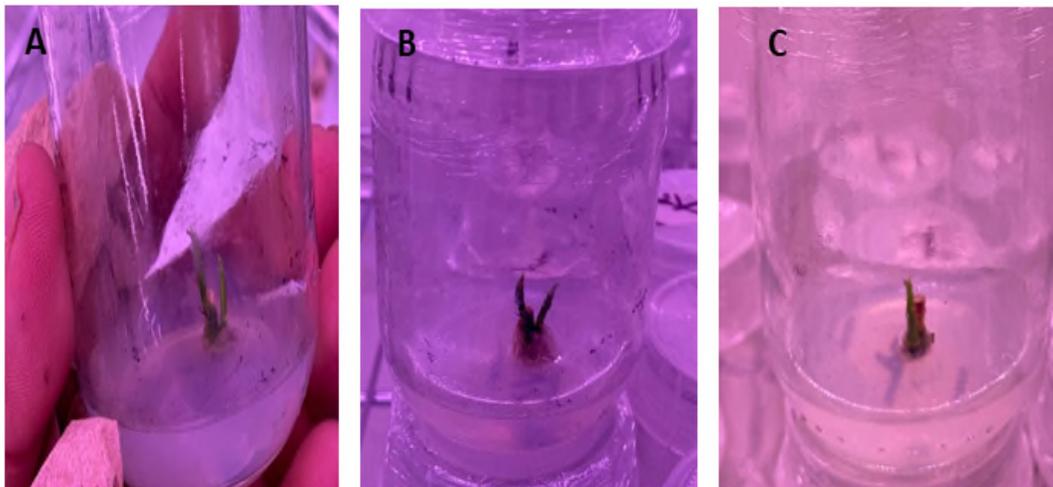


Figura 20. Callos de candelilla

*a) callos en el tratamiento T1; callos en el tratamiento T2; callos en el tratamiento T3.

Posteriormente, se observó el crecimiento de raíces a los 20 días de incubación en los tratamientos T3 y T4 (Figura 21).

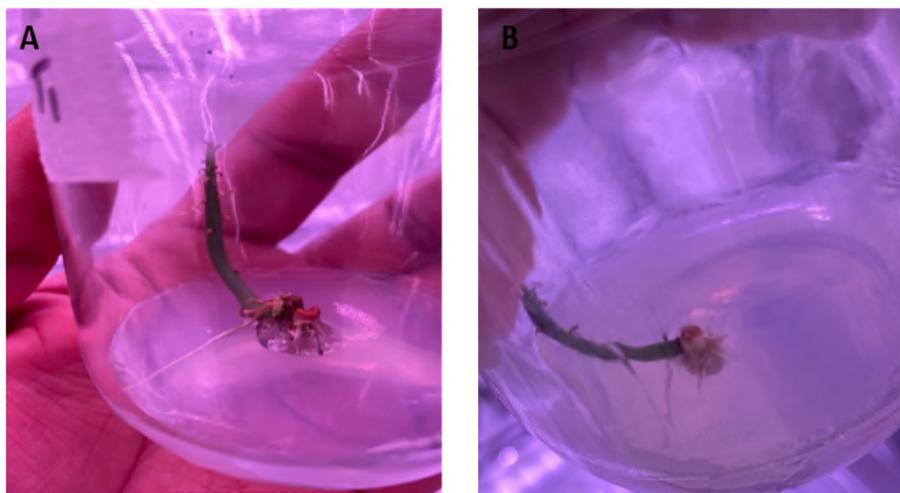


Figura 21. Raíces de candelilla

*a) Raíces en el tratamiento T3; b) Raíces en el tratamiento T4

4.1. Multiplicación por el tratamiento T0 (Testigo)

En la multiplicación por medio semisólido de explantes laterales de candelilla, solo hubo dos brotes en la réplica (Figura 22A3 y A6) mostrando una tonalidad verde fuerte en los dos brotes que hubo. Los demás explantes presentaron necrosis (Figura A1, A2, A4, A7, A8).

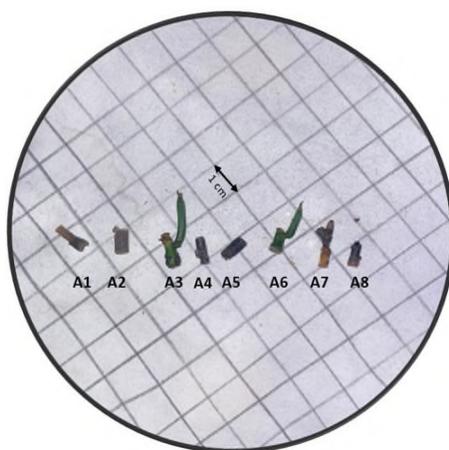


Figura 22. Explantes del tratamiento 0. Barra de escala = 1 cm

4.2 Multiplicación del tratamiento uno (T1)

Se observaron cinco brotes B1, B2, B3, B5 y B8 (Figura 23), los explantes B2, B3 y B8 (Figura 23) mostraron brotes intensos de color verde a comparación del explante B5 (Figura 23) que, aunque mostraba brotación, se observó un color amarillo en su brote y fue el único explante en este tratamiento en el que se le observó una raíz. El explante B1 (Figura 23) no mostró brotación, sin embargo, hubo crecimiento de callo, siendo el único en este tratamiento lo cual concuerda con lo reportado por Bernadac, 2022. En las réplicas B4, B6, B7, B9 y B10 (Figura 23) no se observó brotación de algún tipo, además, de que mostraron oxidación.

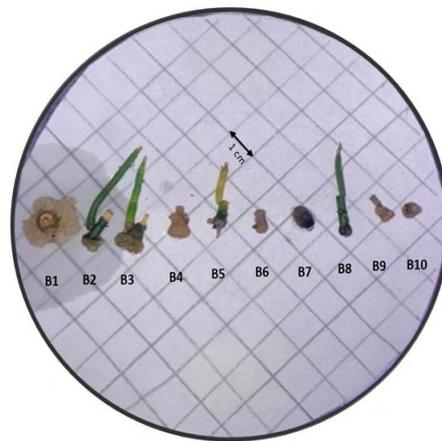


Figura 23. Explantes del tratamiento 1. Barra de escala = 1 cm

4.3 Multiplicación del tratamiento dos (T2)

Se observó la multiplicación de dos explantes laterales, mostrando tres brotaciones C1, C2 y C4 (Figura 24), en la réplica C4 (Figura C4) no hubo brotación, pero el explante se mantuvo del color similar a las réplicas C1 y C2. Los explantes de la réplica C5, C6, C7, C8, C9 y C10 no mostraron brotación alguna y presentaron necrosis en dichas repeticiones |

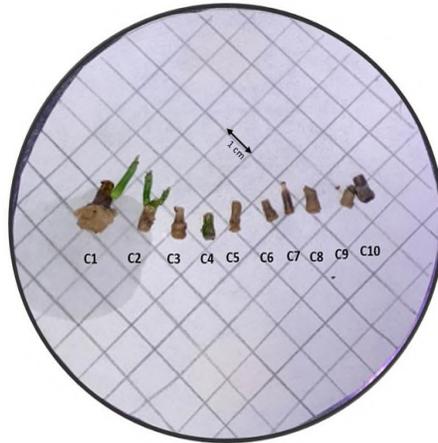


Figura 24. Explantes del tratamiento 1. Barra de escala = 1 cm

4.4 Multiplicación del tratamiento tres (T3)

Hubo crecimiento vegetativo en todas las réplicas, siendo unos de los tratamientos efectivos en este experimento. Las réplicas D1, D2, D3 y D4 (Figura 25) mostraron mayor crecimiento de longitud y ancho. Las réplicas D1, D2, D7 y D8 (Figura 25) mostraron mayor número de raíz. En la réplica D9 se observaron solo dos entrenudos y a diferencia de la réplica D10 mostró oxidación en su crecimiento. Las réplicas que más mostraron mayor número de entrenudos son D1, D2, D4 y D8. Respecto a los callos, todas las réplicas presentaron brotación (D1, D2, D3, D4, D7 y D9), se observó significancia a comparación de las demás réplicas.



Figura 25. Explantes del tratamiento 4. Barra de escala = 1 cm

4.5 Multiplicación por el tratamiento cuatro (T4)

La evaluación del tratamiento T4 del medio semisólido fueron 9 brotes D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9) (Figura 26) de los cuales las réplicas con mayor longitud fueron D1, D2, D3 y D4. Las réplicas que mostraron mayor número raíz fueron las réplicas de la D1, D3, D4 y D9. En este tratamiento se observó crecimiento de callos en la mayoría de réplicas, con excepción de la réplica D10) siendo el único explante en mostrar oxidación

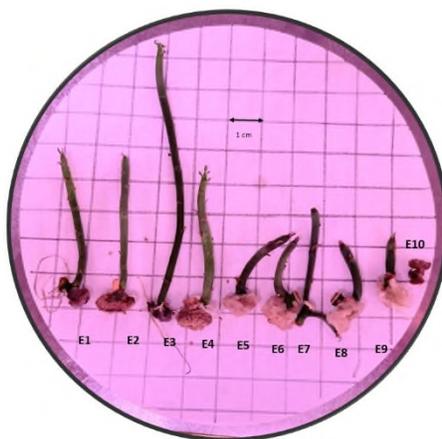


Figura 26. Explantes del tratamiento 3. Barra de escala = 1 cm

4.6 Análisis estadístico

Cuadro 6. comparación de medias mediante la prueba de Turkey de la evaluación de los **tratamientos** para la multiplicación en el sistema semisólido para la multiplicación *in vitro*.

Cuadro 6. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de medios de cultivo evaluados.

TRAT	LP (mm)	AT (mm)	NR (mm)	NE (mm)	LC (mm)	AC (mm)
0	7.827a	2.254 a	0 a	0.3 a	0.927 a	1.305 a
1	11.933ab	2.101a	0.1 a	1.8 ab	3.794 ab	3.308 ab
2	7.617a	3.355ab	0.1 a	1.2ab	1.273 ab	1.83 ab
3	42.292c	2.255a	4.2 c	5.6 c	11.262 c	10.265 c
4	33.788c	2.066a	0.8 ab	5.9 c	6.834 b	6.566 b

*Letras iguales denotan que no existe significancia estadística con $p > 0.05$ Longitud de planta LP (mm), ancho de tallo AT (mm), número de raíces NR (mm), número de entrenudos NE (mm), Longitud de callo LC (mm) y Ancho de callo AC (mm).

Cuadro 7. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable Longitud de planta.

TRAT	0	1	2	3	4
LP	7.827 a	11.933 ab	7.617 a	42.292 c	33.788 c

*Letras iguales denotan que no existe significancia estadística con $p > 0.05$ Longitud de planta LP (mm).

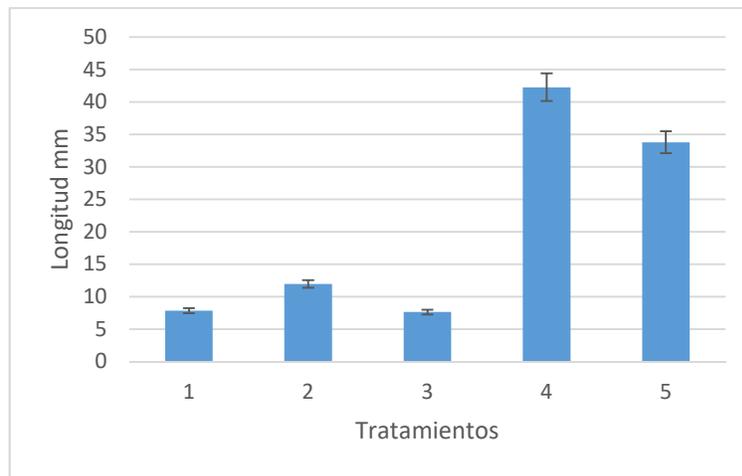


Figura 27. Evaluación de la variable longitud de planta.

Cuadro 8. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable ancho de tallo.

TRAT	0	1	2	3	4
AT	2.254 a	2.101 a	3.355 ab	2.255 a	2.066 a

*Letras iguales denotan que no existe significancia estadística con $p > 0.05$ ancho de tallo AT (mm).

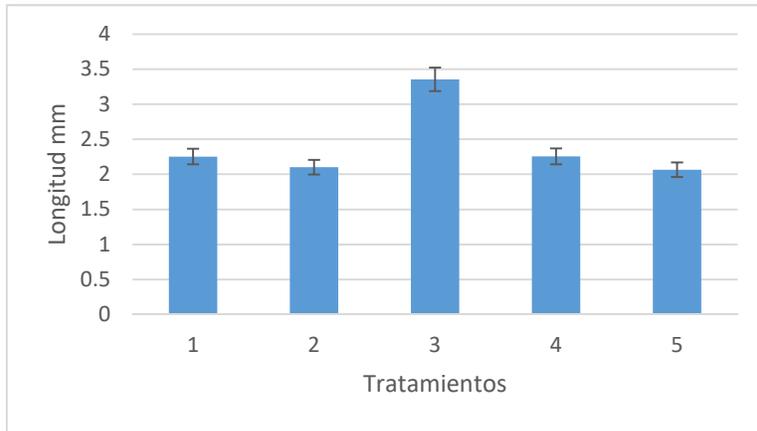


Figura 28. Evaluación de la variable Ancho de tallo.

Cuadro 9. Prueba de medias de Tukey de la evaluación de la variable número de raíces.

TRAT	0	1	2	3	4
NR	0 a	0.1 a	0.1 a	4.2 c	0.8 ab

*Letras iguales denotan que no existe significancia estadística con $p > 0.05$, número de raíces NR (mm).

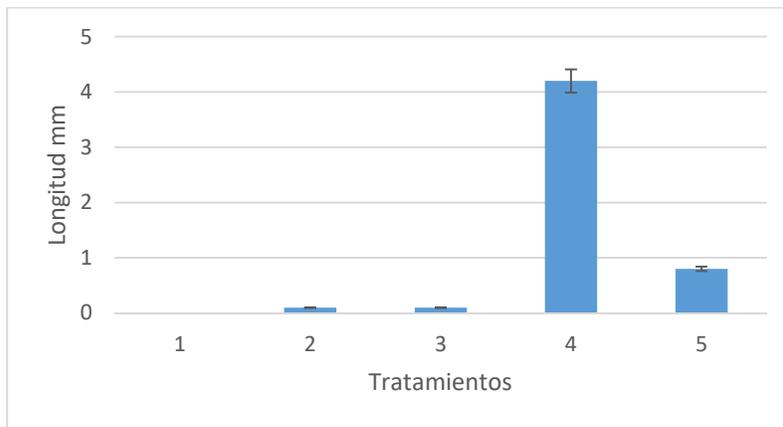


Figura 29. Evaluación de la variable Número de raíces.

Cuadro 10. Prueba de medias de Turkey de la evaluación de la variable número de entrenudos.

TRAT	0	1	2	3	4
NE	0.3 a	1.8 ab	1.2 ab	5.6 c	5.9 c

*Letras iguales denotan que no existe significancia estadística con $p > 0.05$, número de entrenudos NE (mm).

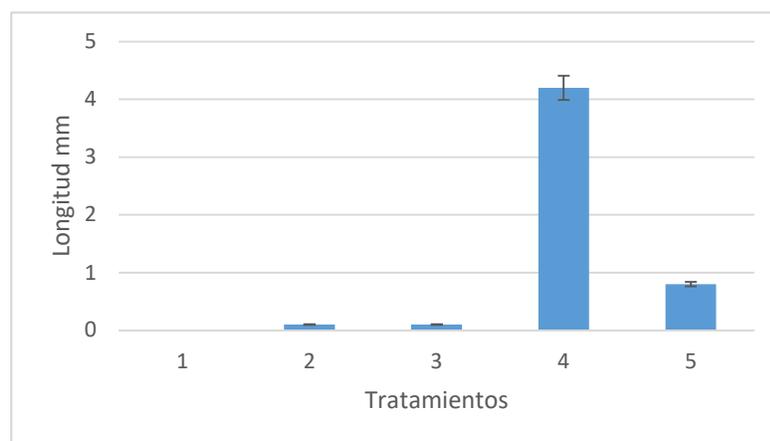


Figura 30. Evaluación de la variable número de entrenudos

V. CONCLUSIONES

El uso de un medio enriquecido como el Woody Plant (WP), con nutrientes específicos como nitrato de calcio, sulfato de potasio y sulfato de magnesio indujeron mayor longitud y número de brotes en explantes de *Euphorbia antisyphilitica* durante su multiplicación *in vitro*.

La comparación de diferentes medios de cultivo demostró que el uso de WP tiene un efecto mayor y positivo en la producción de explantes, longitud y número de brotes en la etapa de multiplicación durante la micropropagación de candelilla, siendo el primer reporte de protocolo utilizando este medio.

VI. LITERATURA CITADA

- Adame, H., & México desconocido. (2010, August 18). Fiesta de la Candelilla, singular tradición de Higuera Nuevo León. <https://www.mexicodesconocido.com.mx/fiesta-de-la-candelilla-singular-tradicion-de-higuera-nuevo-leon.html>
- Alvarado, C. J. C., Galindo, A. S., Bermúdez, L. B., Berumen, C. P., Orta, C. Á., & Garza, J. A. V. (2013). Cera de Candelilla y sus aplicaciones. *Avances en química*, 8(2), 105-110.
- Alvarado, C. J. C., Galindo, A. S., Bermúdez, L. B., Berumen, C. P., Orta, C. Á., & Garza, J. A. V. (2013). Cera de Candelilla y sus aplicaciones. *Avances En Química*, 8(2), 105–110.
- Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, 35, 109–131.
- Andrews, M., and Hammatt, N. (2002). The use of basal media in legume biotechnology research: A critical appraisal. *Plant Science Review*, 92(5).
- Avila Rebollar, F. (n.d.). La Candelilla (*Euphorbia Antisyphilitica* zucc.) En el norte de zacatecas.
- Baquero Peñuela, J. E., & Salamanca Solís, C. R. (2006). Nutrición y fertilización con macro y micronutrientes.
- Bartolomé Hernández, H. A., & Flores López, C. (n.d.). Sobrevivencia en tres plantaciones de candelilla (*euphorbia antisyphilitica* zucc.) en diferentes condiciones en el Noreste de Coahuila.
- Bernadac Meza, B. A. (2022). *Desarrollo de un protocolo productivo in vitro de candelilla (Euphorbia Antisyphilitica) para su propagación.*
- CAR. (1990). *El manto de la tierra*. Bogotá. Ediciones Lerner.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.
- Cervantes, M. C. (2005, May 26). Plantas De Importancia Económica En Zonas Áridas Y Semiáridas De México.
- Cites. (2009). Evaluación del estatus de *Euphorbia antisyphilitica* en México dentro de los apéndices de la citas. Buenos Aires.
- CONABIO, A. C. C. (2021). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- CONABIO. (2008, December 17). Conservación, uso y comercio de la candelilla-Taller Nacional . bp011_taller_candelilla_171208.pdf (www.gob.mx)
- CONAFOR. (2021, August 5). Candelilla, un valioso recurso natural no maderable.
- De Jesús Montalvo, E. (2019). Supervivencia y crecimiento de una plantación de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en Mazapil, Zacatecas de México, A. C. C. (2021). *antisyphilitica*.
- Duval, R. (2006). Hormonas vegetales para el crecimiento y desarrollo de la planta. *Revista de Industria, Distribución y Socioeconomía Hortícola: Frutas, Hortalizas, Flores, Plantas, Árboles Ornamentales y Viveros*. Vol, 196, 22–27.
- FAO. (1989). *Manual sobre semillas de acacias en zonas secas*. FAO. Roma.
- Flores-del Ángel, M. L., Foroughbakhch, R., Rocha-Estrada, A., Cárdenas-Ávila, M. L., Guzmán-Lucio, M. A., Hernández-Aguilar, Y. L., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2013). Morfología, viabilidad y germinación de semillas de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.). *Phyton* (Buenos Aires), 82(2), 161–167.
- Granillo, M. A. (2017, July 2). Evaluación del estado de conservación y potencial de aprovechamiento sustentable de la candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) en zonas bajo aprovechamiento.

- Gresshoff, P. M., & Doy, C. H. (1974). Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 73(2), 132-141.
- Gresshoff, P. M. (1980). In vitro culture of white clover: callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Botanical Gazette*, 141(2), 157-164.
- Hernández, B., & Antelmo, H. (2017). Sobrevivencia en tres plantaciones de candelilla (*euphorbia antisyphilitica* zucc.) en diferentes condiciones en el Noreste de Coahuila.
- INIFAP. (2016, December 17). Inventario Nacional de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) Fase I. <https://www.gbif.org/dataset/ecbb2874-d2a4-4400-b57e-00b8ebcd3a9c>
- Instituto de Candelilla. (2013). Planta de Candelilla . https://www.candelilla.org/?page_id=528&lang=es
- Jones, Mi. (2001, June 11). Google Earth. <https://www.google.es/earth/>
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de Tejidos En La Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT, 41–77.
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de Tejidos En La Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT, 41–77.
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de Tejidos En La Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT, 41–77.
- Kyrkby, E., & Römheld, V. (2008). Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas*, 68, 1–3.
- LLOYD, G. y McCOWN, B. 1981. Woody plant medium (WPM): A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant. species. *HortScience*. 16:453.
- López Cortés, B. (2007). Producción de plantula de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) por hijuelos: dosis de fertilización y aplicación de riegos.
- lucerederma. (2022, April 26). Lucerederma . <https://lucerederma.com/cgi-sys/suspendedpage.cgi>

- Marie Anne. (2021, November 21). Cuidado de *Euphorbia Antisyphilitica*: Todo sobre el cultivo de Candelilla. <https://annemarieproject.org/es/cuidado-de-euphorbia-antisyphilitica-todo-sobre-el-cultivo-de-candelilla/>
- Martínez, M. (2013). *Ecología y usos de especies forestales de interés comercial de las zonas áridas de México: Vol. I (1st ed.)*.
- Maycotte-de la Peña, M. L., Robles-Parra, J. M., & Tafolla-Arellano, J. C. (2021). Prácticas para un desarrollo local sustentable en comunidades rurales candelilleras, el caso de dos ejidos de Coahuila, México. *Revista Agraria*, 18(3), 51–60.
- Molina, R. R., de León Zapata, M. A., Cantú, D. J., & Aguilar, C. N. (2011). Pasado, presente y futuro de la candelilla. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(6), 7–18.
- Molina, R. R., Pompa, S. S., Zapata, M. A. D. L., Cantú, D. J., & Aguilar, C. N. (n.d.). PAST, Present And Future Of Candelilla. *Antes Ciencia Forestal En México*, 7.
- Murashige, T y Skoog FS (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 433-497
- Pellegrini, P. A. (2011). *Dinámicas de innovación en biotecnología vegetal: Estudios de caso en empresas de Argentina y Francia*.
- Perera, M. F., García, M. G., Noguera, A. S., Sepúlveda Tusek, M., Filippone, M. P., & Castagnaro, A. P. (2010). Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(2), 13-21.
- Ramírez López, E. (2022). *Modelo de predicción de volumen de cera de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) extraída en tres Ejidos del Estado de Coahuila*.
- Rocha-Estrada, A., Foroughbakhch-Pournavab, R., Guzmán-Lucio, M. A., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2021). Candelilla, *Euphorbia antisyphilitica* Zucc., aprovechamiento tradicional en el Norte de México. *Revista Ciencia UANL*, 24(110), 19–28.
- Rocha-Estrada, A., Foroughbakhch-Pournavab, R., Guzmán-Lucio, M. A., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2021). Candelilla, *Euphorbia antisyphilitica* Zucc., aprovechamiento tradicional en el Norte de México. *Revista Ciencia UANL*, 24(110), 19–28.

- Rubio, M. E. M., Espinosa, C., & Padrón, R. A. G. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, 351–410.
- Sanchez, F. (2011, September 15). Saper Organic Skincare. <https://www.saper.es/>
- SEGOB. (2014, August 14). Norma Oficial Mexicana “NOM-018-RECNAT-2012” .
- Sofía de Teresa. (2014, March). La explotación de la candelilla y los retos para su preservación. <https://bwp-mex.blogspot.com/2014/03/la-explotacion-de-la-candelilla-y-los.html>
- SRNIF. (2021, April 12). Especies Forestales Maderables y No Maderables Sujetas a Aprovechamiento. SRNIFCusos Candelilla – Secretaría de Medio Ambiente (sma.gob.mx)
- Suárez, L. C., Fonseca, A. Á., & Fernández, R. R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 47–56.
- Suárez Padrón, I. E. (2020). Cultivo de tejidos vegetales.
- Valencia, E. A. C., Ibarra, M. A. I., López, M. C. A. R., & Ávalos, J. E. (n.d.). Dra. Ma. Magdalena Villa Castorena.
- Vela, W. M., Wong, J. A. C., & Poma, V. S. P. (2024). Optimización de un medio de cultivo para la conservación in vitro y el establecimiento de un banco de germoplasma. *RevIA*, 14(17), 38–46.
- Villa-Castorena, M., Catalán-Valencia, E. A., Inzunza-Ibarra, M. A., González-López, M. de L., & Arreola-Ávila, J. G. (2010). Producción de plántulas de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.) mediante estacas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 16(1), 37–47.