

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) mediante organogénesis directa e indirecta”

Por:

**BRISA ADRIANA BERNADAC MEZA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.) mediante organogénesis directa e indirecta”

Por:

**BRISA ADRIANA BERNADAC MEZA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

---

**DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA  
ARELLANO**  
Asesor Principal UAAAN

---

**DRA. ESMERALDA JUDITH CRUZ  
GUTIÉRREZ**  
Asesor Principal Externo

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

“Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*)  
mediante organogénesis directa e indirecta”

Por:

**BRISA ADRIANA BERNADAC MEZA**

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



**Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez**  
Asesor principal externo



**M. C. Luis Bernardo Rincón López**  
Asesor



**Dr. Juan Manuel Pichardo González**  
Asesor



**MC. Sergio Sánchez Martínez**  
Coordinador de la División de  
Ingeniería

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Diciembre, 2022.

## **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



---

**Brisa Adriana Bernadac Meza**

Autor principal



---

**Dr. Julio César Tafolla Arellano**

Asesor Principal

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* por permitirme formar parte de esta gran casa de estudios y por convertirse en mi segundo hogar, gracias a mi *alma terra mater* por todo lo aprendido y por las experiencias vividas, además es donde forme amistades que serán para siempre.

Agradezco al *CNRG* por darme la oportunidad de realizar una estancia en la que me ayudaron a concluir mi tesis, aprendí muchas cosas, y mi tiempo en Jalisco me hizo crecer mucho como persona, además de que conocí a grandes personas que me llenaron de conocimientos y risas.

Agradezco al proyecto de innovación: “Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc). UAAAN-38111-425405001-2921. Por el financiamiento para desarrollar esta tesis.

Agradezco al *Dr. Julio César Tafolla Arellano* por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y sobre todo por la confianza de que podía lograr más de lo que yo me propusiera, le agradezco por dejarme experimentar, trabajar y practicar libremente en el laboratorio, gracias a eso aprendí muchas cosas y fue un punto clave en mi desarrollo profesional porque gracias al *LBBM* me enamoré de las plantas.

Agradezco a la *Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez* por la haberme aceptado como su practicante y sobre todo por haber aceptado formar parte de mi comité de asesores, gracias a usted aprendí muchas cosas y logré superarme porque su ritmo de trabajo me hizo proponerme a trabajar a la par y al mismo nivel lo que me hizo esforzarme más y superarme.

Agradezco al *Dr. Juan Manuel Pichardo González* por su paciencia y por haberme transmitido sus conocimientos con respecto a lo estadístico, gracias por tomarse el tiempo

para asegurarse de que yo aprendiera y supiera de donde se obtiene los resultados y cómo interpretarlos, además le agradezco porque su actitud siempre transmite buenas vibras.

Agradezco al **M. C. Bernardo Rincón** por las enseñanzas en el laboratorio y sobre todo por inducirme por el camino del Cultivo de Tejidos Vegetales.

## DEDICATORIA

A mis padres ***Pablo Adrián Bernadac Graciano*** y ***Norma Leticia Meza Gottfried***, al igual que a mis abuelos ***Salvador Meza Ceniceros*** y ***Aurelia Gottfried Martínez*** que han sido mi principal fuente de apoyo y motivación en todos los años de mi vida, además de creer en mí, gracias por educarme de esta manera y enseñarme que nada es fácil y que con esfuerzo y dedicación puedo conseguir todo lo que desee y me proponga en esta vida, gracias por todo y por esta herencia que es la escuela, no existe mejor herencia que las herramientas para defenderme y luchar en la vida.

A ***Dios*** quien ha sido quien me ha guiado por el buen camino de mi ser y siempre me ha protegido donde quiera que me encuentre. Él ha sido quien me ha proporcionado la oportunidad de vivir y disfrutar de todo lo bello que ofrece la existencia en esta tierra.

A mi tío ***David Humberto Meza Gottfried*** quien me ha apoyado en todo lo que se me ofrezca y por ser como un amigo para mí, además de brindarme sabios consejos, al igual que mi tía ***Mónica Cedillo***.

A mi mejor amiga ***Paulina Gallardo Alcántara*** quien siempre ha creído en mí y me ha apoyado en todo momento. En ella he encontrado diversión, risas, conocimientos, entre más.

A mi gran amor ***Martín Armenta Rangel*** por estar ahí para mí a pesar de la distancia, por apoyarme y por escucharme siempre, en él encontré una fuente de inspiración para seguir adelante día a día para poder luchar siempre por mis sueños, de él he aprendido muchas cosas, como por ejemplo que a pesar de todo y de las circunstancias con mucho esfuerzo, sacrificio y dedicación podré cumplir todas mis metas y superarme como persona, así como él lo ha logrado a pesar de todo.

A mis ***Sueños***, si le dedico esta tesis a todos mis sueños que sin ellos no estaría donde estoy.

A **Zaret** <sup>(Zara)</sup> por ser un gran soporte en los días grises al escribir la tesis estando a 638 km de nuestro nido y por el apoyo e inspiración cuando las ganas de seguir adelante se escondían detrás de esa montaña llamada ÉXITO.

A mis mejores amigas de la universidad **Nallely, Sonia, Gaby, Polet, Carmina, Lidia, Joseline**, principalmente por ser mis amigas desde tiempos inmemorables y por el apoyo, porque siempre estuvieron ahí y la unión que formamos es inigualable, gracias por ser como son porque entre todas nos complementamos y nunca nos abandonamos, las quiero mucho.

A mi mejor amigo de la universidad **Leonel** por ser de esas personas que creen en mí y me alienta a seguir echándole ganas, además de sus sabios consejos y sobre todo gracias por los ratos de diversión y risas que son las que me llevo.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO .....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
DEDICATORIA .....	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO .....	IX
ÍNDICE DE CUADROS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XV
RESUMEN .....	XVIII
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b> .....	1
<b>1.1 Justificación</b> .....	2
<b>1.2 Hipótesis</b> .....	3
<b>1.2.1 Hipótesis General</b> .....	3
<b>1.2.2 Hipótesis Específicas</b> .....	3
<b>1.3 Objetivos</b> .....	3
<b>1.3.1 Objetivo General</b> .....	3
<b>1.3.2 Objetivos Específicos</b> .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.</b> .....	5
<b>2.1 Generalidades de la candelilla</b> .....	5
<b>2.1.1 Botánica</b> .....	6
<b>2.1.1.1 Morfología de la planta</b> .....	7
<b>2.1.1.2 Requerimientos edafoclimáticos</b> .....	10
<b>Clima</b> .....	10
<b>Tipo de suelo</b> .....	10
<b>2.1.1.3 Forma de reproducción</b> .....	10
<b>2.1.1.4 Formas de propagación</b> .....	10
<b>Por semilla</b> .....	11
<b>Por estaca</b> .....	11
<b>Por hijuelos</b> .....	12
<b>2.1.1.5 Distribución</b> .....	12
<b>2.2 Usos y aplicaciones de la candelilla</b> .....	13
<b>2.3 Importancia de la candelilla</b> .....	14
<b>2.3.1 Importancia social y económica</b> .....	14

2.3.2	Importancia ecológica .....	15
2.4	Extracción de cera de candelilla .....	15
2.5	Amenazas .....	16
2.6	Biotecnología Vegetal .....	17
2.6.1	Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) .....	17
2.6.1.1	Teoría celular y totipotencia .....	17
2.6.1.2	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales .....	18
2.6.1.3	Propagación de plantas <i>in vitro</i> .....	18
2.6.1.4	Organogénesis Directa .....	19
2.6.1.5	Organogénesis Indirecta .....	19
2.6.1.6	Sistemas de Inmersión Temporal .....	19
2.6.1.7	Conservación a largo plazo .....	19
	Crioconservación .....	19
	Crecimiento Mínimo .....	19
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1	<b>SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE EN CAMPO</b> .....	<b>20</b>
3.1.1	Selección y recolección del material vegetal .....	20
3.1.2	Ubicación .....	20
3.1.3	Preparación del material vegetal .....	21
3.2	<b>DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES EN LABORATORIO</b> .....	<b>22</b>
3.2.1	Material Vegetal .....	22
3.2.2	Tratamientos .....	23
3.2.3	Esterilización .....	24
3.2.4	Cultivo <i>in vitro</i> .....	24
3.2.5	Diseño experimental .....	25
3.2.6	Análisis estadístico .....	25
3.3.1	Material Vegetal .....	25
3.3.2	Tratamientos .....	25
3.3.3	Esterilización .....	26
3.3.4	Cultivo <i>in vitro</i> .....	26
3.3.5	Diseño Experimental .....	27
3.3.6	Análisis estadístico .....	27

<b>3.4 EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO EN LOS TRES EJIDOS (SAN JERÓNIMO, TORTUGA Y ESTANQUE DE LEÓN)</b> .....	28
3.4.1 Material vegetal .....	28
3.4.2 Tratamientos.....	28
3.4.3 Esterilización .....	28
3.4.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	29
3.4.5 Diseño experimental.....	29
3.4.6 Análisis estadístico.....	30
3.5.1 Material vegetal.....	30
3.5.2 Tratamientos.....	30
3.5.3 Esterilización .....	31
3.5.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	31
3.5.5 Diseño experimental.....	32
3.5.6 Análisis estadístico.....	32
<b>3.6 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA</b> .....	32
3.6.1 Material vegetal .....	32
3.6.3 Esterilización .....	33
3.6.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	33
3.6.5 Diseño experimental.....	34
3.6.6 Análisis estadístico.....	34
<b>3.7 DIFERENCIACIÓN CAULINAR</b> .....	34
3.7.1 Material vegetal.....	34
3.7.2 Tratamientos.....	34
3.7.3 Esterilización .....	35
3.7.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	35
3.6.5 Diseño experimental.....	36
3.6.6 Análisis estadístico.....	36
<b>3.8 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (RITA)</b> .....	36
3.8.1 Material vegetal.....	36
3.8.2 Tratamientos.....	36
3.8.3 Esterilización .....	37
3.8.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	37
3.8.5 Diseño experimental.....	38

3.8.6 Análisis estadístico.....	38
<b>3.9 CRECIMIENTO MÍNIMO .....</b>	<b>38</b>
3.9.1 Material vegetal .....	38
3.9.2 Tratamientos.....	38
3.9.3 Esterilización .....	39
3.9.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	39
3.9.5 Diseño experimental.....	40
3.9.6 Análisis estadístico.....	40
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 ESTABLECIMIENTO .....</b>	<b>43</b>
Análisis Estadísticos .....	43
<b>4.3 EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO EN LOS 3 EJIDOS (SAN JERÓNIMO, TORTUGA Y ESTANQUE DE LEÓN) .....</b>	<b>47</b>
Análisis Estadísticos .....	47
<b>4.4 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 DIFERENCIACIÓN DE CALLOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.7 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (RITA).....</b>	<b>57</b>
<b>4.8 CRECIMIENTO MÍNIMO .....</b>	<b>60</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos evaluados para el establecimiento de candelilla. ....	26
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos de establecimiento para los 3 ejidos.....	28
<b>Cuadro 4.</b> Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para multiplicación por organogénesis directa.....	31
<b>Cuadro 5.</b> Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para el aumento de la masa caulinar para multiplicación por organogénesis indirecta.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para la diferenciación de callos. ....	35
<b>Cuadro 7.</b> Tratamientos evaluados para la multiplicación <i>in vitro</i> de candelilla en Sistemas de Inmersión Temporal (RITA). ....	37
<b>Cuadro 8.</b> Tratamientos evaluados para la conservación <i>in vitro</i> de candelilla en Crecimiento Mínimo. ....	39
<b>Cuadro 9.</b> Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos de desinfección en candelilla. ....	41
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de desinfección de candelilla. ....	41
<b>Cuadro 11.</b> Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos de establecimiento de candelilla. ....	43
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de establecimiento de candelilla. ....	44
<b>Cuadro 13.</b> Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos de establecimiento de candelilla con base a los tres ejidos de procedencia.....	47
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación del establecimiento con base a los tres ejidos de procedencia.....	48
<b>Cuadro 15.</b> Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos de multiplicación por organogénesis directa de candelilla. ....	50
<b>Cuadro 16.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de la multiplicación de candelilla por organogénesis directa. ....	50
<b>Cuadro 17.</b> Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos evaluados para la multiplicación por organogénesis directa de candelilla. ....	52
<b>Cuadro 18.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de multiplicación por medio de organogénesis indirecta para el aumento de masa caulinar. ....	53

<b>Cuadro 19.</b> Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos evaluados en la diferenciación de callos. ....	55
<b>Cuadro 20.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para la diferenciación de los callos. ....	55
<b>Cuadro 21.</b> Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de multiplicación por medio del sistemas de inmersión temporal RITA.....	57
<b>Cuadro 22.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para la multiplicación en el sistemas de inmersión temporal RITA. ....	57
<b>Cuadro 23.</b> Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de crecimiento mínimo. ....	60
<b>Cuadro 24.</b> Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para crecimiento mínimo. ....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta adulta de candelilla ( <i>Euphorbia antisiphilitica</i> Zucc.).	7
<b>Figura 2.</b> Brotes de la planta de la candelilla.	8
<b>Figura 3.</b> a) Floración de la planta de candelilla; b) Cera de candelilla (Berrum-Aguilar, 2021).	8
<b>Figura 4.</b> Frutos de la planta de candelilla (Castorena <i>et al.</i> , 2008).	9
<b>Figura 5.</b> Semillas de la planta de candelilla (Castorena <i>et al.</i> , 2008).	9
<b>Figura 6.</b> Distribución potencial de la planta de candelilla en México (CITES, 2009).	13
<b>Figura 7.</b> Áreas de aplicación de la planta de candelilla.	14
<b>Figura 8.</b> Proceso de producción de la cera de candelilla.	16
<b>Figura 9.</b> Recolección de la planta de candelilla.	20
<b>Figura 10.</b> a) Ejido San Jerónimo, b) Ejido Tortuga y c) Ejido Estanque de León.	21
<b>Figura 11.</b> Hijuelos de planta de candelilla en macetas.	21
<b>Figura 12.</b> Brotes de la planta de candelilla para la obtención de yemas axilares y meristemos apicales.	22
<b>Figura 13.</b> Autoclave para esterilizar los medios de cultivo.	24
<b>Figura 14.</b> a) Explantes de 1 cm ± 1 de longitud de candelilla; b) Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de candelilla.	24
<b>Figura 15.</b> a) Testigo; b) Antioxidante “A” T1; c) Antioxidante “A” T2; d) Antioxidante “A” T3; e) Antioxidante “A” T4; y f) Antioxidante “A” T5.	27
<b>Figura 16.</b> a) Explantes de San Jerónimo; b) Explantes de Tortuga; y c) Explantes de Estanque de León.	29
<b>Figura 17.</b> Explantes establecidos en cultivo <i>in vitro</i> de candelilla de dos meses de crecimiento.	30
<b>Figura 18.</b> Explante de candelilla para su multiplicación <i>in vitro</i> , disco de 1.55 ± 0.05 mm de longitud.	31
<b>Figura 19.</b> Callos generados en la etapa de multiplicación por organogénesis directa.	32
<b>Figura 20.</b> Callos cultivados <i>in vitro</i> de candelilla.	33
<b>Figura 21.</b> Callos obtenidos de la etapa de multiplicación por organogénesis directa.	34
<b>Figura 22.</b> Callos cultivados <i>in vitro</i> de candelilla.	35
<b>Figura 23.</b> Cultivo <i>in vitro</i> de los explantes de candelilla en sistemas de inmersión temporal (RITA).	38
<b>Figura 24.</b> Cultivo <i>in vitro</i> de los explantes de candelilla para su conservación en crecimiento mínimo.	40

<b>Figura 25.</b> Explantes obtenidos con el tratamiento 2 de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.....	42
<b>Figura 26.</b> Explantes contaminados del tratamiento testigo de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.....	42
<b>Figura 27.</b> Explantes contaminados del tratamiento 1 de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.....	42
<b>Figura 28.</b> Explantes obtenidos del tratamiento testigo en la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla sin Antioxidante A. ....	44
<b>Figura 29.</b> Resultados obtenidos del Tratamiento 1 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.....	44
<b>Figura 30.</b> Explantes de candelilla enraizados en establecimiento en concentraciones del Tratamiento 1. ....	45
<b>Figura 31.</b> Resultados obtenidos del Tratamiento 2 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.....	45
<b>Figura 32.</b> Resultados obtenidos del Tratamiento 3 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.....	46
<b>Figura 33.</b> Resultados obtenidos del Tratamiento 4 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.....	46
<b>Figura 34.</b> Resultados obtenidos del Tratamiento 5 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.....	46
<b>Figura 35.</b> Explantes del Ejido de San Jerónimo establecidos en cultivo <i>in vitro</i> . ....	48
<b>Figura 36.</b> Explantes del Ejido de Tortuga establecidos en cultivo <i>in vitro</i> . ....	48
<b>Figura 37.</b> Explantes del Ejido de Estanque de León establecidos en cultivo <i>in vitro</i> . ..	49
<b>Figura 38.</b> Explantes <i>in vitro</i> de candelilla del Testigo.....	50
<b>Figura 39.</b> Explantes <i>in vitro</i> de candelilla del Tratamiento 1. ....	51
<b>Figura 40.</b> Explantes <i>in vitro</i> de candelilla del Tratamiento 2. ....	51
<b>Figura 41.</b> Explantes <i>in vitro</i> de candelilla del Tratamiento 3. ....	51
<b>Figura 42.</b> Callos de candelilla <i>in vitro</i> , Tratamiento Testigo. ....	53
<b>Figura 43.</b> Callos de candelilla <i>in vitro</i> , Tratamiento 1. ....	53
<b>Figura 44.</b> Callos de candelilla <i>in vitro</i> , Tratamiento 2. ....	54
<b>Figura 45.</b> Callos de candelilla <i>in vitro</i> , Tratamiento 3. ....	54
<b>Figura 46.</b> Callo <i>in vitro</i> de candelilla, Tratamiento Testigo. ....	55
<b>Figura 47.</b> Callo <i>in vitro</i> de candelilla, Tratamiento 1. ....	56
<b>Figura 48.</b> Callo <i>in vitro</i> de candelilla, Tratamiento 2. ....	56
<b>Figura 49.</b> Explantes del cultivo <i>in vitro</i> de candelilla en SIT, tratamiento testigo. ....	58

<b>Figura 50.</b> Explantes del cultivo <i>in vitro</i> de candelilla en SIT, Tratamiento 1. ....	58
<b>Figura 51.</b> Explantes del cultivo <i>in vitro</i> de candelilla en SIT, Tratamiento 2. ....	59
<b>Figura 52.</b> Explantes del cultivo <i>in vitro</i> de candelilla en SIT, Tratamiento 3. ....	59
<b>Figura 53.</b> Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, Tratamiento Testigo 1. ....	61
<b>Figura 54.</b> Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, Tratamiento Testigo 2. ....	61
<b>Figura 55.</b> Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, tratamiento 2.....	61

## RESUMEN

*Euphorbia antisyphilitica* Zucc. mejor conocida como candelilla, forma parte de los 10 productos forestales no maderables de mayor importancia económica en México para zonas áridas, es considerada una especie endémica de las regiones semidesérticas del norte de México y sur de EUA. Produce cera que recubre sus tallos largos y erectos de color verde grisáceos, la cual es extraída para su uso en diferentes aplicaciones. Debido a su gran interés dentro de la industria esta especie es sobreexplotada, lo que provoca una pérdida de variantes naturales, por ende, la reducción del germoplasma. Actualmente, no se ha desarrollado un protocolo eficiente para su propagación *in vitro* que nos permita multiplicar a gran escala esta planta para su recuperación y conservación en áreas explotadas, por lo que el objetivo del presente proyecto fue desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de candelilla mediante organogénesis directa e indirecta

El establecimiento de candelilla se logró mediante el uso de un antioxidante (A) en el Tratamiento 2 en combinación del Tratamiento 2 de desinfección (detergente + alcohol + captan + cloro + tween 20), en donde los explantes se mantuvieron en condiciones de asepsia, produjeron brotes y hubo la presencia de raíces, además, se observó que los explantes de candelilla se multiplican por medio de organogénesis directa a partir de yemas axilares y de meristemas apicales en el tratamiento 2 (MS + IAA + KIN), en donde los explantes mostraron brotes adventicios y elongación y a su vez la producción de callos en la parte basal del explante. Por otro lado, la multiplicación en los sistemas de inmersión temporal (RITA), se logró mediante el uso de reguladores de crecimiento (AIB + 2iP), en donde se produjo la mayor elongación de los brotes y hubo presencia de callos en la parte basal. Por último, la conservación por medio de crecimiento mínimo se logró con el tratamiento 2 (MS “modificado” + sacarosa + manitol + antioxidante (A), en donde los explantes se mantuvieron de 1 cm, sin oxidación y sin contaminación.

Palabras clave: Candelilla, Establecimiento, Organogénesis directa e indirecta, Sistemas de Inmersión Temporal, Crecimiento Mínimo, Masa caulina

## I. INTRODUCCIÓN.

La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.), es una especie importante para México debido a que de ella se obtiene una muy buena calidad de cera que es comercializada en México y exportada al extranjero. Siendo así de gran importancia para la industria. La candelilla es una especie endémica de las regiones semidesérticas del país; se encuentra en los estados de Coahuila, Chihuahua, Zacatecas, Oaxaca, Durango, Nuevo León, Hidalgo, Tamaulipas, Querétaro y Puebla, dentro del territorio estadounidense se encuentra en los estados de Texas y Nuevo México. Esta especie crece principalmente en laderas de suelo calcáreo, las cuales se asocian con formaciones de material rocoso. La raíz de la candelilla es pequeña relativamente, a pesar de que la planta es de tamaño moderado puede llegar a desarrollar más de 100 tallos de color verde grisáceo, de 30-60 cm de largo y alrededor de 0.1-1.0 cm de diámetro, y en conjunto forman un arbusto de 90 cm de diámetro aproximadamente (Instituto de la Candelilla, 2013).

La producción de cera de candelilla se remonta a los años de 1900, desde ese entonces se ha convertido de gran importancia económica para las regiones candelilleras, de las cuales por más de 100 años se han visto beneficiados alrededor de 3,500 productores del norte de México, distribuidos en 230 ejidos de 33 municipios del país. Una de las cualidades que hacen sumamente valiosa a esta planta es que su cera es de excelente calidad y cuenta con una vasta producción, lamentablemente por lo mismo, ésta especie está siendo sobreexplotada, ya que aproximadamente el 90% de la producción de la cera es exportada al extranjero, por lo que se ha reducido su germoplasma (CONAFOR, 2021).

Por tal motivo, el objetivo de este proyecto de investigación fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) mediante de organogénesis directa e indirecta para su recuperación y conservación, contribuyendo a la problemática de la sobreexplotación de la especie, debido a que después del corte de esta planta para su recolección, su regeneración puede tardar de 4 a 5 años en comparación a su explotación que es casi diaria.

## 1.1 Justificación

Esta investigación se enmarca en el objetivo 15 de la agenda ONU: Vida y de ecosistemas terrestres, que consiste en proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de 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 (Moran & Jara, 2020). La candelilla es una especie altamente explotada y cuenta con una NORMA Oficial Mexicana NOM-018-RECNAT-1999, que establece los procedimientos, criterios y especificaciones técnicas y administrativas para realizar el aprovechamiento sostenible de la hierba de candelilla, transporte y almacenamiento del cerote (SEMARNAT, 2009).

La planta de candelilla cuenta con una gran importancia social, económica y ecológica en México, y de esta se obtiene cera de alta calidad que es exportada en su mayoría a nivel mundial, desafortunadamente debido a la alta demanda la especie ha pasado de ser una especie no amenazada a una especie amenazada y en peligro de extinción. Se han desarrollado diferentes protocolos de propagación para candelilla, sin embargo, no han sido del todo eficientes (citas de los previos). Por tal motivo, el objetivo de esta investigación es el desarrollo de un protocolo productivo para la propagación *in vitro* de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) para su recuperación y conservación, para contribuir a la problemática de la sobreexplotación de la especie, debido a que después de la recolección de la planta su regeneración tarda de 4 a 5 años para obtener plantas adultas listas para recolectar en comparación de su explotación que es diaria, con el desarrollo de este protocolo se podrán obtener plantas con calidad genética y sanitaria para su recuperación y conservación, haciendo uso de herramientas de biotecnología vegetal.

## **1.2 Hipótesis**

### **1.2.1 Hipótesis General**

El uso de diferentes antioxidantes y de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en las concentraciones adecuadas propiciará un medio de cultivo ideal para el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y conservación *in vitro* de la candelilla.

### **1.2.2 Hipótesis Específicas**

- El uso de bajas concentraciones de cloro por tiempo más prolongado permitirá la desinfección de los explantes.
- El uso de Antioxidante “A” como antioxidante favorecerá la inhibición de los compuestos fenólicos para lograr el establecimiento de los explantes de candelilla.
- El uso de reguladores de crecimiento en las concentraciones indicadas permitirá multiplicar los explantes por medio de organogénesis directa, indirecta y por medio de sistemas de inmersión temporal.
- El uso del ácido salicílico en la concentración adecuada permitirá el crecimiento mínimo para los explantes de candelilla para su conservación *in vitro*.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) para la recuperación y conservación de la especie.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar el potencial de diferentes métodos de desinfección para el establecimiento de candelilla.
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para el establecimiento de candelilla.

- Evaluar el potencial de plantas de las comunidades de San Jerónimo, Zacatecas, Estanque de León y de Tortuga, Coahuila para el establecimiento de candelilla.
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para el establecimiento de candelilla por medio de organogénesis directa.
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para el aumento de la masa de caulinar para la producción de callos de mayor tamaño para la multiplicación de candelilla por organogénesis directa.
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para la diferenciación de callos de candelilla, inducción de brotes y enraizamiento de la planta.
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para la multiplicación de candelilla por medio de Sistemas de Inmersión Temporal (RITA).
- Evaluar el potencial de diferentes medios de cultivo con diferentes reguladores para la conservación de candelilla a largo plazo por medio de crecimiento mínimo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1 Generalidades de la candelilla

*Euphorbia antisyphilitica* Zucc. mejor conocida como candelilla, es una especie endémica de México específicamente del Desierto de Chihuahua (CONAFOR, 2021). La planta de candelilla tiene similitudes a los cactus, esto por ser pertenecer a la familia *Euphorbiaceae*, pero, lo que la hace diferente es su producción de látex, además, de que se extrae cera natural de sus tallos, esto debido a que su parte externa se encuentra recubierta por un material ceroso, por lo que la planta presenta tallos largos y erectos de color verde grisáceo, este material ceroso le brinda protección ante las condiciones extremas en las que se encuentra, al igual, que la protege de bacterias, hongos e insectos (Rojas-Molina *et al.*, 2011).

Una de las características que vuelve muy importante a esta planta es la producción de cera, la cual se remonta desde el año de 1900 para su uso, su descubrimiento se les atribuye a los apaches del norte, quienes empleaban la cera de candelilla para proteger la cuerda de sus arcos de los cambios de temperatura. Hoy en día es uno de los recursos naturales con mayor apreciación dentro de diferentes industrias, tanto cosméticas hasta como electrónicas, entre otras, sus usos se consideran muy diversos (CONAFOR, 2021).

Además de la cera, la candelilla es una fuente de otros compuestos fitoquímicos como las fibras y los compuestos polifenólicos, como el ácido gálico y la catequina, de igual manera, posee fitomoléculas bioactivas de calidad, en mayor cantidad con diversas aplicaciones potenciales en la industria utilizándose como agentes antioxidantes y antimicrobianos, brindando grandes ventajas tecnológicas (Rojas-Molina *et al.*, 2020).

La cera de candelilla cuenta con propiedades únicas lo que la hace una especie de gran importancia en México, específicamente para las zonas candelilleras del país, por ésta misma razón la cera de candelilla se ha convertido de alta demanda para los mercados internacionales para sus diversos usos. Para poder satisfacer al mercado, se estima que se producen alrededor de 3,000 toneladas por año de cera, para los cuales se necesitan

aproximadamente 150,000 toneladas de planta por año, solamente del 1.5 al 3.3 % del peso seco total de la planta corresponde a la cera producida, lo que representa una amenaza para las poblaciones de candelilla (Flores-Del Ángel, 2012; Maycotte de la Peña et al., 2021).

### **2.1.1 Botánica**

La candelilla fue descrita por primera vez en el año de 1832 por Joseph Gerhard Zuccarini, quien notó que la planta era utilizada con fines medicinales específicamente para tratar enfermedades venéreas como la sífilis de ahí su especie *antisyphilitica*. En el año de 1909, surgió una nueva clasificación para la candelilla que fue registrada por G. Alcocer (*Euphorbia cerífera*), destacando su capacidad de producir cera para su propia protección contra las temperaturas extremas actuando como un sello para retener la humedad (Rojas-Molina *et al.*, 2011).

La taxonomía de la candelilla es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Dicotyledoneae*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Euphorbiales*

Familia: *Euphorbiaceae*

Subfamilia: *Euphorbioideae*

Género: *Euphorbia*

Especie: *antisyphilitica*

### 2.1.1.1 Morfología de la planta

*Euphorbia antisiphilitica* Zucc. es una planta perenne de múltiples tallos, cilíndricos y con una ramificación simpodial, estos son de color verde blancuzco, debido al material ceroso que los recubre. La planta de la candelilla llega a alcanzar una altura de 40 hasta 100 cm con un diámetro de 5mm (Figura 1) (Castorena *et al.*, 2008).



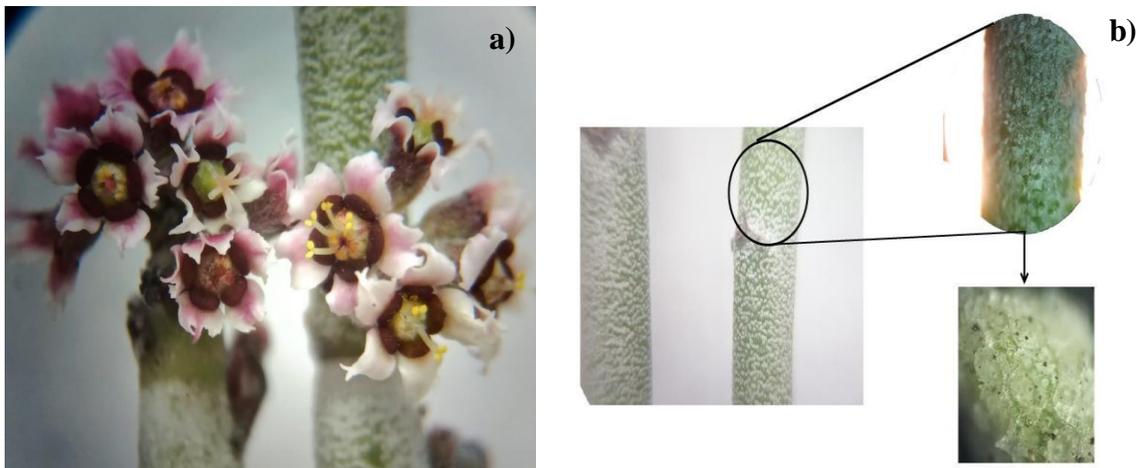
**Figura 1.** Planta adulta de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.).

Sus brotes son de color verde claro y en ocasiones con tramos rojizos. Las hojas que presenta la candelilla no suelen verse debido a que son muy pequeñas, sésiles y de poca duración, suelen ser visibles alrededor de 10 a 15 días, las hojas se encuentran alternadas y de forma opuesta con longitud de 0.5 a 1 cm y de ancho de 1 a 3 mm, por lo general se localizan en las zonas de nuevo crecimiento del tallo como en la zona de los meristemos apicales (Figura 2) (Castorena *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Brotes de la planta de la candelilla.

La candelilla también cuenta con flores las cuales se reúnen en inflorescencias que se encuentran conjuntas en racimos, son hermafroditas y su estructura es en forma de copa, la cual es conocida como ciato, cada una contiene entre 45 y 47 flores masculinas, mientras que sólo cuenta con una flor femenina, la cual se encuentra en el centro y no siempre se desarrolla, estas flores son de color blanco con tonalidades rosas (Figura 3) (Castorena *et al.*, 2008).



**Figura 3.** a) Floración de la planta de candelilla; b) Cera de candelilla (Berrum-Aguilar, 2021).

El fruto de la candelilla es una cápsula trilobular la cual pende de un pedúnculo largo, cuando el fruto alcanza la madurez toma una coloración café la cual puede variar de tonalidades (Figura 4) (Castorena *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Frutos de la planta de candelilla (Castorena *et al.*, 2008).

Mientras que las semillas de la candelilla pueden variar en su tonalidad desde un blanco hasta un tono café claro, suelen ser muy pequeñas, alrededor de 1000 semillas pueden llegar a pesar 4.1g (Figura 5) (Castorena *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Semillas de la planta de candelilla (Castorena *et al.*, 2008).

Por otro lado, la raíz de la planta de la candelilla es relativamente pequeña, es de color café claro y son muy numerosas, a pesar de esto una planta de tamaño medio puede llegar a desarrollar más de 100 tallos, formando arbustos (Instituto de la Candelilla, 2013).

### **2.1.1.2 Requerimientos edafoclimáticos**

#### **Clima**

La candelilla se desarrolla bajo condiciones extremas, su clima predominante es seco, semicálido y durante todo el año las lluvias son escasas, su porcentaje de precipitación durante el invierno es del 18%. En las regiones candelilleras la temperatura media anual ronda entre los 20°C y 22°C, la planta de la candelilla es resistente a las condiciones extremas, llega a resistir temperaturas máximas de 47°C hasta temperaturas mínimas de -14°C, y su precipitación media anual ronda entre los 120 y 200 mm (Castorena *et al.*, 2008).

#### **Tipo de suelo**

La candelilla se localiza en suelos del tipo calcáreos, con origen coluvial y una profundidad somera menor de 25 cm, la textura del suelo es franco arenoso, de estructura granular con una consistencia friable, con presencia de rocas y piedras, con un pH que puede variar entre 7.0 y 7.4 (Castorena *et al.*, 2008).

### **2.1.1.3 Forma de reproducción**

Su reproducción puede ser de dos formas, ya sea sexualmente por semilla o asexualmente por brotes de sus tallos subterráneos y por sus tallos aéreos, (Castorena *et al.*, 2008), la forma más común de reproducirse es por medio de la propagación vegetativa del rizoma (Decimotava reunión del Comité de Flora, 2009).

### **2.1.1.4 Formas de propagación**

La candelilla se puede propagar de 3 formas, ya sea por semilla, estacas o por hijuelos.

### **Por semilla**

Propagar la candelilla mediante semilla es la forma menos recomendada, debido a su difícil recolección, porque cuando su fruto llega a la madurez, este se revienta dejando caer las semillas, y por su tamaño, es difícil localizarlas para poder recolectarlas, además de que su porcentaje de viabilidad es muy bajo. Su periodo de recolección es entre abril y julio, pero esto puede variar dependiendo del temporal de lluvias, puede ser desde febrero hasta agosto. Para la siembra de las semillas el mejor período es durante los meses de marzo a junio, en estos meses es cuando la candelilla crecerá más rápido dado a que las condiciones de luz y temperatura son las idóneas para esta, si su siembra se llegará a realizar a finales del verano o del invierno se puede prolongar su emergencia más de 30 días, su crecimiento del tallo será lento y su brotación puede tardar hasta 4 meses (Castorena *et al.*, 2005).

### **Por estaca**

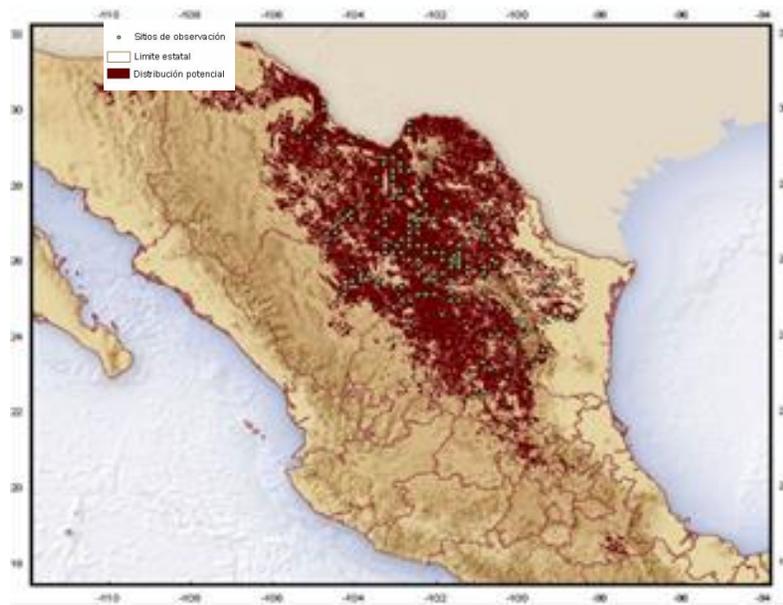
Para la propagación de la candelilla por medio de estacas, la recolección de los tallos se puede llevar a cabo durante todo el año, para el corte de la estaca se debe realizar a partir de la parte media respetando entre 20-25 cm y de 3 a 4 nudos por estaca, deben de tener buen aspecto y verse fuertes, una vez cortadas se dejan alrededor de siete días para que los cortes formen callo o se sellen. La plantación de las estacas se lleva a cabo en las primeras horas de la mañana en bolsas de plástico negro de 3 L, se colocan dos estacas por bolsa, clavando de 3 a 4 cm de la estaca bajo tierra y enterrando al menos un nudo por estaca, se utiliza como sustrato una mezcla de turba con arena (2:1, v:v) o de igual manera se puede utilizar turba con perlita y vermiculita (2:1:1, v:v:v); para asegurar una humedad adecuada un día antes de la plantación se realiza un riego previo a las bolsas con el sustrato y es recomendable realizar la plantación a principios de la primavera, para obtener una brotación temprana y crecimiento de brotes, la brotación ocurrirá de 30 a 40 días después de su plantación. Para poder llevar las plantas propagadas por estaca al campo primero tienen que pasar por un proceso de aclimatación, a los 18 meses de haber plantado las estacas las plantas estarán listas para llevarse a campo, éstas contarán con alrededor de 7 tallos, una altura promedio de 35 a 40 cm y un sistema radical bien desarrollado (Castorena *et al.*, 2005).

## **Por hijuelos**

Para propagar la candelilla por medio de hijuelos su recolección se tiene que realizar después de un periodo de lluvias, los hijuelos recolectados deben de tener una altura de 17 a 20 cm y con dos tallos cada uno, una vez recolectados, estos se llevan a un lugar sombreado por un tiempo de 10 a 14 días para que la parte basal de los hijuelos forme callo, transcurrido este tiempo se siembran los hijuelos en bolsas negras de plástico de 3 L durante las primeras horas de la mañana y son llenadas con un sustrato de turba con arena (2:1, v:v), para asegurar una buena humedad, un día antes se satura el sustrato con agua, y el día de la plantación se vuelve a regar el sustrato, esto para evitar que los hijuelos se sequen. Es recomendable realizar la plantación a finales del invierno o a principios de la primavera para obtener una brotación temprana, la cual se dará de 30 a 35 días después de su plantación, de la misma forma que sucede con las estacas, los hijuelos para poder ser llevados a campo tienen que pasar por un proceso de aclimatación, las plantas deben de contar con una edad de 12 a 14 meses después de la plantación y tendrán alrededor de 10 a 12 tallos cada una y una altura promedio de 40 a 45 cm con un sistema radical bien desarrollado (Castorena *et al.*, 2005).

### **2.1.1.5 Distribución**

La planta de la candelilla se distribuye a lo largo del Desierto de Chihuahua en estados como Chihuahua, Nuevo León, Coahuila, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas, Hidalgo, Querétaro, Oaxaca y Puebla (Figura 6). La candelilla ocupa un área potencial que va de entre 30,129,896 ha. hasta las 32,420,133 ha. De igual manera podemos encontrar candelilla en Estados Unidos en el estado de Texas y Nuevo México, la mayor parte de esta crece en una faja que se extiende entre los meridianos 102° y 103° N, desde el Río Bravo y continúa hasta el paralelo 24° (Decimoctava reunión del Comité de Flora, 2009).



**Figura 6.** Distribución potencial de la planta de candelilla en México (CITES, 2009).

## 2.2 Usos y aplicaciones de la candelilla

La planta de la candelilla produce una cera que representa un producto natural muy valioso para diferentes industrias, sus usos van desde la industria cosmética hasta la industria electrónica (Figura 7). La candelilla es de gran valor en estas industrias debido a que cuenta con características únicas de alta calidad, por ejemplo, cuenta con un color amarillo transparente, como cera natural presenta mayor dureza ante otras, mejor brillo y fácil digestión, además de que no es tóxica, dentro del proceso de moldeo de precisión o cera perdida, cuenta con mayor eficiencia gracias a su alto punto de fundición ( $77.4^{\circ}\text{C}$ ) y su bajo índice de contracción. El inicio del uso de la planta de candelilla se remonta a miles de años atrás, por ejemplo, los indios apaches la utilizaban para curtir pieles y tensar sus arcos, de igual manera, le daban usos medicinales como para calmar el dolor de muelas o como un purgante. Durante la época colonial, los españoles utilizaron la cera de la planta para elaborar velas, de ahí viene el nombre de candelilla el cual significa “vela pequeña”, después en el siglo XX, se inició la comercialización de esta especie a nivel mundial siendo controlada por extranjeros, de igual manera en esta época surgió el proceso de extracción de cera usado en la actualidad, el cual consiste en poner a hervir la planta de candelilla con ácido sulfúrico para la extracción del cerote. Durante la Segunda Guerra Mundial incrementó la demanda de

cera debido a que en esa época la utilizaban como impermeabilizante y para proteger de los mosquitos las telas que cubrían las casas de campaña, otro uso que se le daba era para prevenir el deterioro y cubrir algunas partes de los aviones, y para la elaboración de explosivos (Canales *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Áreas de aplicación de la planta de candelilla.

### **2.3 Importancia de la candelilla**

La planta de la candelilla es considerada uno de los recursos naturales más importantes del noreste de México (CONABIO, 2008), su importancia se debe a la cubierta cerosa de sus tallos, la cual se trata de una cera natural dura que cuenta con características de dureza, impermeabilidad, brillo y estabilidad química, debido a que está formada por resinas, lactonas, ésteres e hidrocarburos, que son productos químicos orgánicos con un alto peso molecular. Gracias a sus características fisicoquímicas ha podido conquistar tanto el mercado nacional, así como el internacional, debido a sus diversos usos en la elaboración y acabados de gran variedad de productos (Cervantes, 2005).

#### **2.3.1 Importancia social y económica**

Actualmente la importancia socioeconómica de la candelilla es indiscutible, en los estados áridos como Coahuila, Zacatecas, Nuevo León, Chihuahua y Durango se cubre un área de

350 000 km<sup>2</sup> aproximadamente, produciéndose anualmente 3 millones de toneladas de cerote, beneficiando cerca de 21,000 familias. En el estado de Zacatecas y Chihuahua se producen alrededor de 108.000 toneladas de cerote beneficiando a 1351 y 810 familias respectivamente, mientras que en Durango y Coahuila se producen 210 000 y 1494 toneladas de cerote beneficiando a 353 y 290 familias aproximadamente (Cervantes, 2005). El 90 % de la cera producida es exportada a otros países como Estados Unidos, Argentina, Japón, Colombia, Alemania, Italia, España, Irlanda, Francia, Inglaterra y Holanda, debido a la gran demanda que tiene por ser de excelente calidad, lo que la hace de gran importancia económica para el país beneficiando a poco más de 3 500 productores distribuidos en 230 ejidos dentro de los 33 municipios candelilleros del norte del país (CONAFOR, 2021).

### **2.3.2 Importancia ecológica**

La planta de candelilla es de gran importancia ecológica debido a que cumple con funciones importantes dentro de los ecosistemas desérticos en los que habita. Es una especie que, a través del crecimiento de sus macollos retiene partículas del suelo y humedad, lo que beneficia el establecimiento de otras especies, esta función que cumple es muy importante considerando que se trata de una especie altamente resistente a la sequía, por otro lado, también protege al suelo del efecto del viento y de la radiación solar, evitando su erosión (Protección de la Fauna Mexicana A. C., 2015).

### **2.4 Extracción de cera de candelilla**

El gran atractivo de esta especie es la cera que produce debido a la gran calidad con la que cuenta, considerándose una de las tres mejores ceras naturales a nivel mundial, pero ¿Cómo se obtiene esta cera? El método de extracción de cera de candelilla se ha utilizado por más de cien años, este método fue diseñado por Borrego y Flores, la técnica de extracción de cera consiste en la recolección de la planta total para posteriormente llevarla a ebullición en una solución de agua con ácido sulfúrico, para obtener el primer producto llamado cerote, y pueda continuar su proceso de refinado para convertirse en cera (Figura 8), la extracción de cera de candelilla se convirtió de gran importancia económica para el Desierto Chihuahuense desde el siglo XX (Rojas-Molina *et al.*, 2011).



**Figura 8.** Proceso de producción de la cera de candelilla.

## 2.5 Amenazas

El sobre aprovechamiento del recurso, el sobrepastoreo, los incendios forestales y la ganadería extensiva son unas de las principales amenazas hacia la planta de la candelilla. Desde los años 40 's se inició con el aprovechamiento de esta planta de forma muy intensiva sin tomar en cuenta medidas para la recuperación de sus poblaciones naturales. Actualmente su recolección se realiza de forma periódica para el aprovechamiento sustentable que contempla acciones de recuperación y de mitigación. La ganadería extensiva y sin control es una de las prácticas más comunes dentro de las zonas candelilleras, esta práctica provoca que el suelo se compacte y se reduzca la capacidad de infiltración de este.

Por otro lado, el manejo inadecuado del uso del fuego provoca incendios en los ecosistemas desérticos dañando el hábitat de la candelilla. Por último, no se conocen enfermedades o plagas importantes que se encuentren afectando a la especie, sin embargo, se han descubierto insectos parasitando plantas de candelilla, algunos de estos insectos suelen ovipositar en el interior de sus tallos y dentro de ellos se desarrollan las larvas, se encuentra reportado un díptero de la familia *Cecidomycidae* (Decimoctava reunión del Comité de Flora, 2009).

## **2.6 Biotecnología Vegetal**

Durante el pasar de los años la humanidad ha ido generando conocimiento relacionado a la domesticación y establecimiento de cultivos de plantas, en donde las prácticas iniciales se basaban en el uso de injertos y propagación por medio de esquejes y estacas, siembra de semillas y métodos de mejoramiento genético vegetal seleccionando especies de interés, etc., en un inicio estas prácticas carecían de fundamentos científicos, no fue hasta que se estableció la teoría celular moderna y la teoría de la totipotencia celular que se les pudo dar una explicación científica y estas teorías fueron la clave para la biotecnología vegetal, otras de las claves fue el descubrimiento de hormonas vegetales que ahora se conocen como reguladores de crecimiento vegetal lo que dio paso a un avance en el campo del cultivo de células y de tejidos vegetales. Después de estos hallazgos se comenzaron a publicar investigaciones relacionadas a la regeneración de órganos, formación de callos abriendo paso hacia la micropropagación, rescate de embriones y técnicas de doble haploide, por lo que la biotecnología vegetal es una herramienta reconocida tanto para la investigación fundamental como para fines prácticos (Cano & López, 2021).

### **2.6.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)**

Dentro de las prácticas que podemos encontrar dentro de la biotecnología vegetal está el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) el cual se basa en el conjunto de técnicas que permitirán tanto el mantenimiento como el crecimiento ya sea de células, así como de tejidos en un medio nutritivo específico estéril y en condiciones ambientales totalmente controladas. Los tejidos vegetales pueden ser cultivados *in vitro* gracias a que la célula vegetal es totipotente (Daorden, 2012).

#### **2.6.1.1 Teoría celular y totipotencia**

El concepto de totipotencia surge de la teoría celular, la cual menciona que la célula vegetal al igual que la célula animal constituye la unidad básica, común y estructural tanto en plantas como en animales, unificándose así las bases celulares en ambos organismos, descritas por Mattias Schleiden y por Theodor Schwann, por lo que la totipotencia celular afirma que toda

célula contendrá la información suficiente y necesaria para regenerar tanto otras células, así como un organismo entero (Suárez, 2020).

#### **2.6.1.2 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

La aplicación del cultivo de tejidos *in vitro* puede dividirse en: a) Estudios básicos de genética, bioquímica, fisiología y ciencias afines; b) Bioconversión y producción de compuestos útiles; c) Incremento de la variabilidad genética; d) Obtención de plantas libres de patógenos; e) Propagación de plantas; y f) Conservación e intercambio de germoplasma. De lo anterior surge el establecimiento de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, el cual consiste en la selección del explante a establecer y dependerá del tipo de sistema de cultivo que será empleado (Mroginski & Roca, 1991). Los sistemas de cultivo *in vitro* son el cultivo de meristemos, el cultivo de yemas, el cultivo de embriones, el cultivo de anteras y el cultivo de protoplastos (Daorden, 2012).

#### **2.6.1.3 Propagación de plantas *in vitro***

La micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas que se utiliza en el cultivo *in vitro* de plantas, mediante la micropropagación podemos obtener una descendencia uniforme, generando plantas genéticamente idénticas entre sí, conocidas como clones, esto a través de un fragmento de una planta madre conocido como explante. Para que la producción de plantas *in vitro* se lleve a cabo es necesario contar con un medio basal idóneo el cual incluye una mezcla de agua, sales minerales, azúcar, vitaminas, reguladores de crecimiento y agar, tanto el desarrollo como la selección de un medio basal adecuado dependerá de dos factores: 1) de la especie vegetal; y 2) de la etapa del proceso de micropropagación. Además del medio de cultivo es necesario contar con cámaras de incubación donde se pueda colocar las plantas cultivadas *in vitro*, en donde su ambiente estará totalmente controlado con luz artificial para regular sus fotoperiodos y con temperaturas que oscilan entre los 21 y 24° C (Castillo, 2004).

#### **2.6.1.4 Organogénesis Directa**

En la organogénesis indirecta la formación de brotes se lleva a cabo a partir de explantes llamados órganos como las yemas axilares, meristemos apicales, tallos, semillas, etc., esto sin fases intermedias de callos (Martín *et al.*, 2015).

#### **2.6.1.5 Organogénesis Indirecta**

En la organogénesis directa la formación de brotes se lleva a cabo mediante una fase intermedia en la cual se induce a la formación de callos que son una masa de células indiferenciadas listas para diferenciarse y producir brotes (Martín *et al.*, 2015).

#### **2.6.1.6 Sistemas de Inmersión Temporal**

Los sistemas de inmersión temporal permiten la micropropagación de las plantas masivamente en ambientes herméticos y esterilizados, sin embargo, esta tecnología es costosa y un poco complicada (Lugo *et al.*, 2017).

#### **2.6.1.7 Conservación a largo plazo**

La conservación de los tejidos vegetales *in vitro* forma parte esencial de la estrategia general de la conservación y del intercambio de recursos genéticos alrededor de todo el mundo (García-Águila, 2007).

#### **Crioconservación**

Se utiliza para conservar los tejidos vegetales por periodos de tiempo indefinido utilizando temperaturas ultra bajas (García-Águila, 2007).

#### **Crecimiento Mínimo**

Se utiliza para conservar los tejidos vegetales *in vitro* por periodos de tiempo que van de 2 a 3 años (García-Águila, 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en campo y en laboratorio. En el campo se obtuvo el material vegetal y en el laboratorio se desarrolló la parte biotecnológica de la investigación.

#### 3.1 SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE EN CAMPO

##### 3.1.1 Selección y recolección del material vegetal

Para la recolección del material vegetal (Figura 9) se acudió a tres comunidades diferentes para la selección y extracción de la planta madre que se utilizó para el establecimiento *in vitro* de la planta de candelilla. Se extrajeron hijuelos del suelo para posteriormente propagarlos en macetas y conservar el material *ex vitro* en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la UAAAN.



**Figura 9.** Recolección de la planta de candelilla.

##### 3.1.2 Ubicación

Se visitó el Ejido de San Jerónimo, del municipio de Melchor Ocampo, Zacatecas, el Ejido Tortuga del municipio de Ramos Arizpe, Coahuila y el Ejido de Estanque de León, del municipio de Parras, Coahuila (Figura 10), para recolectar candelilla y posteriormente poder

realizar un ensayo de comparación de los tres ejidos, para analizar si existen diferencias significativas entre ellos.



**Figura 10.** a) Ejido San Jerónimo, b) Ejido Tortuga y c) Ejido Estanque de León.

### 3.1.3 Preparación del material vegetal

Una vez ingresado el material en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular UAAAN se colocó en macetas para su propagación *ex vitro* y su conservación (Figura 11), además se mantuvo en observación por varias semanas para asegurar que las plantas estuvieran libres de patógenos y enfermedades para poder llevarlas a cultivo *in vitro*.



**Figura 11.** Hijuelos de planta de candelilla en macetas.

## 3.2 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES EN LABORATORIO

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio Agrícola Forestal Sección *In vitro* y Crioconservación de Tejido Vegetal del Centro Nacional de Recursos de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

En esta fase los explantes se trasladaron del Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular UAAAN al Laboratorio Agrícola Forestal Sección *In vitro* y Crioconservación de Tejido Vegetal del CNRG-INIFAP.

### 3.2.1 Material Vegetal

Se tomaron al azar explantes (yemas axilares y meristemos apicales) provenientes de brotes jóvenes de la comunidad de San Jerónimo (Figura 12). Se evaluaron diferentes protocolos de desinfección para el establecimiento de la candelilla en condiciones *in vitro*. Se utilizó el medio de cultivo MS al 100% y se tomaron como referencia dos métodos de desinfección previamente utilizados por otros autores (Rodríguez, 2012; Flores, 2013) y un método propuesto para esta investigación.



**Figura 12.** Brotes de la planta de candelilla para la obtención de yemas axilares y meristemos apicales.

### **3.2.2 Tratamientos**

#### **Método 1: Desinfección de candelilla (Testigo)**

Los explantes de candelilla fueron desinfectados superficialmente con etanol al 100% por 1 minuto, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y posteriormente fueron inmersos en una solución de cloro al 20% añadiendo 0.5 mL de Tween 20 por 15 minutos, finalmente se realizaron triples enjuague con agua destilada estéril (Flores, 2013).

#### **Método 2: Desinfección de candelilla (Tratamiento 1)**

Los explantes de candelilla fueron desinfectados con jabón comercial y agua destilada, después se realizaron tres enjuagues y fueron inmersos en una solución de cloro al 3% durante 3 minutos, finalmente fueron enjuagados con agua destilada estéril 3 veces (Rodríguez, 2012).

#### **Método 3: Desinfección de candelilla (Tratamiento 2)**

Los explantes de candelilla se lavaron con jabón comercial y agua destilada por 5 minutos seguidos por tres enjuagues, después fueron inmersos en una solución de alcohol al 70% por solo 10 segundos seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, los explantes fueron sumergidos en una solución de Fungicida A Tratamiento 1 por 15 minutos seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en una solución de cloro al 0.75% por un tiempo de 45 minutos, transcurrido este tiempo se le añadió Tween 20 al 0.1 % durante 15 minutos más. Finalmente, se les dio tres enjuagues con agua destilada estéril.

Después de los tratamientos de desinfección, se establecieron los explantes en medio MS al 100%, sacarosa 30 g/L<sup>-1</sup> y agar 8 g/L<sup>-1</sup> con 10 repeticiones para cada tratamiento con la finalidad de seleccionar el mejor tratamiento para los ensayos siguientes.

### 3.2.3 Esterilización

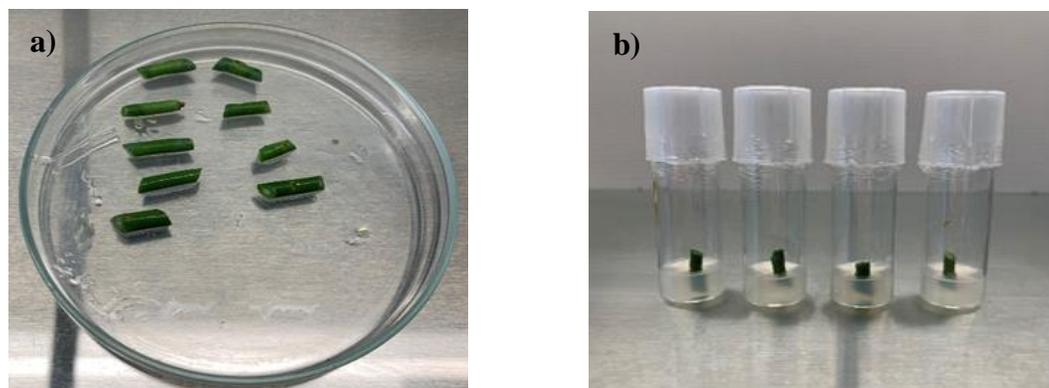
La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave (Figura 13) a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.



**Figura 13.** Autoclave para esterilizar los medios de cultivo.

### 3.2.4 Cultivo *in vitro*

En cabina de flujo laminar, se establecieron los explantes después de los tratamientos de desinfección. Los explantes se obtuvieron mediante cortes rectos de 1 cm de longitud (Figura 14) con un nudo por explante para su cultivo en los diferentes tratamientos, utilizando un explante por frasco (Figura 15), los tubos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.



**Figura 14.** a) Explantes de  $1 \text{ cm} \pm 1$  de longitud de candelilla; b) Cultivo *in vitro* de explantes de candelilla.

### **3.2.5 Diseño experimental**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con un ANOVA ( $\alpha \pm 0.05$ ) con 10 repeticiones. Los datos fueron evaluados a los 5, 10 y 15 días tomando en cuenta las siguientes variables: supervivencia y contaminación.

### **3.2.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## **3.3 ESTABLECIMIENTO**

### **3.3.1 Material Vegetal**

Para este ensayo se tomaron los explantes que se sobrevivieron en el primer experimento. En este ensayo se evaluó la concentración de Antioxidante “A”.

### **3.3.2 Tratamientos**

Se evaluaron cinco tratamientos y un testigo con cuatro repeticiones cada uno, se tomaron como explantes yemas axilares y meristemas apicales para su establecimiento *in vitro* (Cuadro 2). Para el protocolo de establecimiento se tomó como referencia la capacidad antioxidante y antifúngica Antioxidante “A”.

**Cuadro 2.** Tratamientos evaluados para el establecimiento de candelilla.

<b>TESTIGO</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
MS 100%					
Sacarosa 30 g.L <sup>-1</sup>					
Myo-inositol PPM	Myo-inositol PPM	Myo-inositol PPM	Myo-inositol PPM	Myo-inositol PPM	Myo-inositol PPM
---	Antioxidante "A" T1.	Antioxidante "A" T2.	Antioxidante "A" T3.	Antioxidante "A" T4.	Antioxidante "A" T5.
pH 5.7					
Agar	Agar	Agar	Agar	Agar	Agar

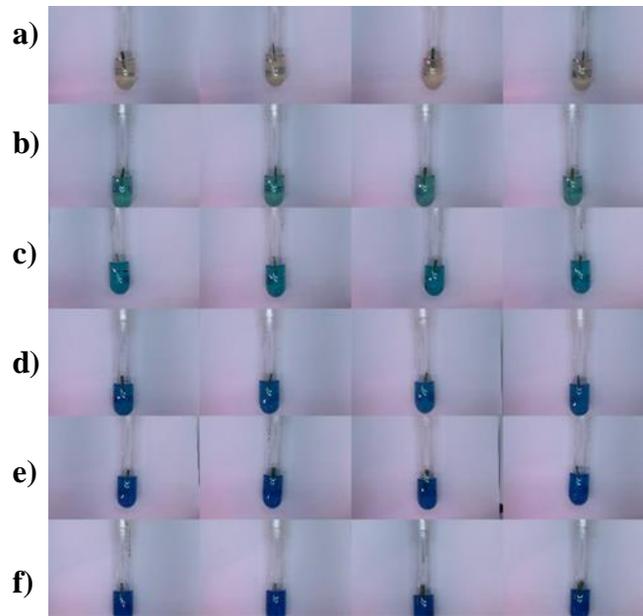
T= Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 20 mL de medio en tubos de vidrio.

### 3.3.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.3.4 Cultivo *in vitro*

Se tomaron yemas axilares y meristemos apicales de una planta madre resguardada en maceta recolectada en la comunidad de San Jerónimo, Zacatecas, los explantes se obtuvieron mediante cortes rectos de 1 cm de longitud priorizando un nudo por explante para su cultivo en los diferentes tratamientos, utilizando un explante por tubo, los tubos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 24 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Figura 15).



**Figura 15.** a) Testigo; b) Antioxidante “A” T1; c) Antioxidante “A” T2; d) Antioxidante “A” T3; e) Antioxidante “A” T4; y f) Antioxidante “A” T5.

Los datos fueron evaluados durante dos meses, tomando en cuenta las siguientes variables: Número. de Brotes, Oxidación y Contaminación.

### **3.3.5 Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones.

### **3.3.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

### 3.4 EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO EN LOS TRES EJIDOS (SAN JERÓNIMO, TORTUGA Y ESTANQUE DE LEÓN)

#### 3.4.1 Material vegetal

Para este ensayo se tomaron al azar explantes provenientes de la comunidad de San Jerónimo municipio de Melchor Ocampo, Zacatecas, Estanque de León, municipio de Parras, Coahuila y Tortuga municipio de Ramos Arizpe, Coahuila para evaluar de qué comunidad sería mejor emplear el material vegetal con el que se trabajará las siguientes fases, evaluando si existen diferencias significativas o no significativas entre cada uno de estos.

#### 3.4.2 Tratamientos

Se evaluaron tres ejidos diferentes con cuatro repeticiones por cada uno, se tomaron como explantes yemas axilares y meristemos apicales para su establecimiento *in vitro*. El medio de cultivo basal que se utilizó se describe en la siguiente tabla (Cuadro 3):

**Cuadro 3.** Tratamientos de establecimiento para los 3 ejidos.

<b>San Jerónimo</b>	<b>Estanque de León</b>	<b>Tortuga</b>
MS 100%	MS 100%	MS 100%
Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>
Myo-inositol	Myo-inositol	Myo-inositol
PPM	PPM	PPM
Antioxidante "A" T1	Antioxidante "A" T1	Antioxidante "A" T1
pH 5.7	pH 5.7	pH 5.7
Agar	Agar	Agar

El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 20 ml de medio en tubos de vidrio.

#### 3.4.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.4.4 Cultivo *in vitro*

Se tomaron yemas axilares y meristemos apicales de una planta madre resguardada en maceta recolectada de los ejidos de San Jerónimo, Estanque de León y Tortuga. Los explantes se obtuvieron mediante cortes rectos de 1 cm de longitud priorizando un nudo por explante para su cultivo en los diferentes tratamientos, utilizando un explante por tubo. Los tubos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura  $24 \pm 2$  °C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Figura 16).



**Figura 16.** a) Explantes de San Jerónimo; b) Explantes de Tortuga; y c) Explantes de Estanque de León.

Los datos fueron evaluados durante dos meses, tomando en cuenta las siguientes variables: Número de Brotes, Longitud del Brote, Oxidación y Contaminación.

### 3.4.5 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con cuatro repeticiones.

### 3.4.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## 3.5 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA

### 3.5.1 Material vegetal

El material vegetal de candelilla utilizado fueron los explantes establecidos en condiciones *in vitro* con un tiempo de dos meses después de su establecimiento (Figura 17).



**Figura 17.** Explantes establecidos en cultivo *in vitro* de candelilla de dos meses de crecimiento.

### 3.5.2 Tratamientos

Se evaluaron tres tratamientos y un testigo con nueve repeticiones cada uno, se tomaron como explantes yemas axilares y meristemas apicales para su multiplicación *in vitro*. El medio de cultivo basal para los cuatro medios del ensayo se describe en la siguiente tabla (Cuadro 4):

**Cuadro 4.** Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para multiplicación por organogénesis directa.

TESTIGO	T1	T2	T3
MS 100%	MS 100%	MS 100%	MS 100%
Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>			
Agar 9 g/L <sup>-1</sup>			
	T1 IAA + T1 BAP	T2 IAA + T2 KIN	T3 KIN

T = Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 40 ml de medio en frascos de vidrio.

### 3.5.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.5.4 Cultivo *in vitro*

Se tomaron yemas axilares y meristemos apicales de las plantas establecidas *in vitro* de candelilla, obteniendo los explantes mediante cortes rectos de  $1.55 \pm 0.05$  mm de longitud con un nudo por disco para su cultivo en los diferentes tratamientos, utilizando un disco por frasco (Figura 18). Los frascos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.



**Figura 18.** Explante de candelilla para su multiplicación *in vitro*, disco de  $1.55 \pm 0.05$  mm de longitud.

Los datos fueron evaluados cada 15 días, tomando en cuenta las siguientes variables: Número de Brotes, Número de Nudos, Longitud del Brote, Ausencia o Presencia de Raíz, Ausencia o Presencia de Callo, Oxidación y Contaminación.

### 3.5.5 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con nueve repeticiones.

### 3.5.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## 3.6 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA

### 3.6.1 Material vegetal

El material vegetal que se utilizó fueron callos obtenidos en la etapa de multiplicación por medio de organogénesis directa, ya que se generaron tanto brotes como callos (Figura 19). Se separaron los callos de los brotes. Los callos obtenidos eran callos friables, pero de menor tamaño, por lo que para esta etapa por medio de organogénesis indirecta se probaron tratamientos para aumentar su masa caulinar y comenzar la multiplicación de estos.



**Figura 19.** Callos generados en la etapa de multiplicación por organogénesis directa.

### 3.6.2 Tratamientos

Se evaluaron tres tratamientos y un testigo con tres repeticiones cada uno. Para el protocolo de aumento de masa caulinar se tomaron como referencia tratamientos reportados en

magnolia para la inducción de callo (García-Beltrán *et al.*,2022) y en Orozú para la desdiferenciación tisular (Urrea *et al.*, 2009). El medio de cultivo basal se describe en la siguiente tabla (Cuadro 5):

**Cuadro 5.** Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para el aumento de la masa caulinar para multiplicación por organogénesis indirecta.

TESTIGO	T1	T2	T3
MS 100%	MS 100%	MS 100%	MS 100%
Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>			
Agar 8 g/L <sup>-1</sup>			
	T1 ANA	T2 2, 4-D	T3 2, 4-D +T3 BAP

T = Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 30 ml de medio en frascos de vidrio.

### 3.6.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.6.4 Cultivo *in vitro*

Se tomaron los callos generados a partir de los brotes obtenidos por organogénesis directa. Se realizaron cortes en la base de los brotes para separar los callos de los brotes y los callos se pasaron como tal al medio de cultivo con los tratamientos para incrementar su masa caulinar (Figura 20). Los frascos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 24 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.



**Figura 20.** Callos cultivados *in vitro* de candelilla.

Los datos fueron evaluados cada semana, tomando en cuenta las siguientes variables respuesta: Incremento caulinar, Oxidación y Contaminación.

### 3.6.5 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con cuatro repeticiones.

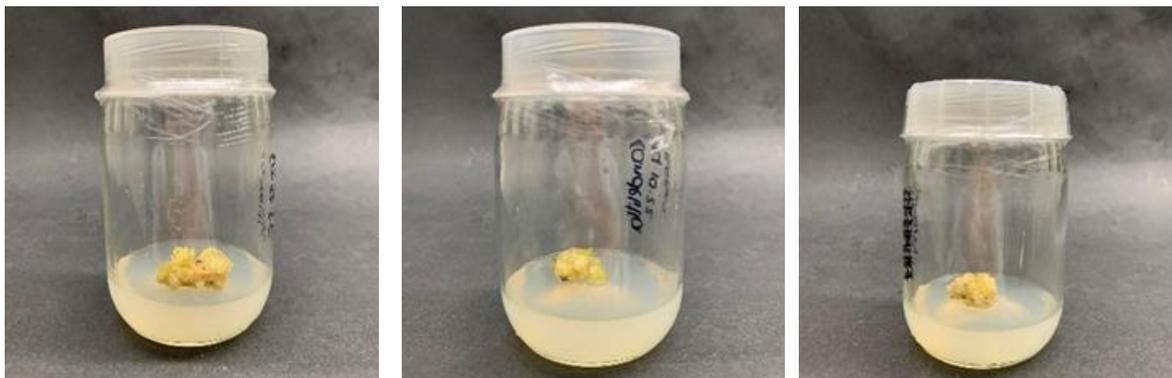
### 3.6.6 Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey ( $\alpha=0.05$ ), utilizando el paquete estadístico SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## 3.7 DIFERENCIACIÓN CAULINAR

### 3.7.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fue el obtenido en la etapa de multiplicación por organogénesis directa (Figura 21). Los callos fueron separados de los brotes. Los callos obtenidos fueron friables y de tamaño considerable.



**Figura 21.** Callos obtenidos de la etapa de multiplicación por organogénesis directa.

### 3.7.2 Tratamientos

Se evaluaron dos tratamientos y un testigo con tres repeticiones cada uno.

El medio de cultivo basal para los cuatro medios del ensayo se describe en la siguiente tabla (Cuadro 6):

**Cuadro 6.** Tratamientos evaluados, comparando la combinación de los reguladores de crecimiento para la diferenciación de callos.

<b>TESTIGO</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
MS 100%	MS 100%	MS 100%
Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>
Agar 8 g/L <sup>-1</sup>	Agar 8 g/L <sup>-1</sup>	Agar 8 g/L <sup>-1</sup>
	T1 ANA + T1 BAP	T2 ANA + T2 BAP

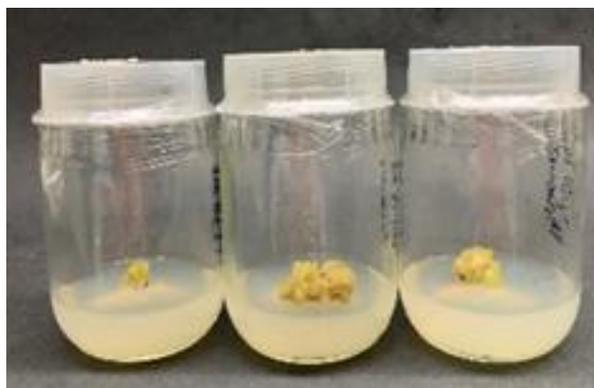
T = Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 30 ml de medio en frascos de vidrio.

### 3.7.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.7.4 Cultivo *in vitro*

Para el cultivo *in vitro* se separaron los callos obtenidos en la etapa de multiplicación por organogénesis directa mediante cortes en la base de los brotes (Figura 22). Los frascos fueron sellados con vitafilm y llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 24 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.



**Figura 22.** Callos cultivados *in vitro* de candelilla.

Los datos fueron evaluados cada semana, tomando en cuenta las siguientes variables: Presencia o Ausencia de callos, Oxidación, Ausencia o presencia de Brotes, Ausencia o Presencia de Raíz y Contaminación.

### **3.6.5 Diseño experimental**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con tres repeticiones.

### **3.6.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## **3.8 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (RITA)**

### **3.8.1 Material vegetal**

El material vegetal de candelilla utilizado fueron los explantes establecidos en condiciones *in vitro* con un tiempo de dos meses después de su establecimiento.

### **3.8.2 Tratamientos**

Para el Sistema de Inmersión Temporal (RITA) fueron evaluados tres tratamientos y un testigo con tres repeticiones cada uno, se utilizaron 4 explantes (2 meristemas apicales y 2 yemas axilares) por RITA para su multiplicación *in vitro* en medio líquido. Para el protocolo de multiplicación en SIT se tomó como referencia tratamientos reportados en *Psidium guajava* L. (Vilchez & Albany, 2014) y en ocumo blanco (Vilchez *et al.*, 2011). El medio de cultivo para los cuatro tratamientos del ensayo estuvo compuesto por los tratamientos descritos en la siguiente tabla (Cuadro 7):

**Cuadro 7.** Tratamientos evaluados para la multiplicación *in vitro* de candelilla en Sistemas de Inmersión Temporal (RITA).

TESTIGO	T1	T2	T3 (Contreras-Loera et al., 2021)
MS 100%	MS 100%	MS 100%	MS 100%
Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 80 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>	Sacarosa 30 g/L <sup>-1</sup>
	T1 Inositol	T2 BAP	T3 1 BAP
	T1 AIB	T2 Ácido Ascórbico	T3 ANA
	T1 2iP	T2 AIA	
Tiempo 1 de Inmersión			

T = Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 250 ml de medio en cada RITA.

### 3.8.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.8.4 Cultivo *in vitro*

Se utilizaron como explantes yemas axilares y meristemos apicales de las plantas establecidas *in vitro* de candelilla, obteniendo los explantes mediante cortes rectos de medio centímetro de longitud con un nudo por explante para su cultivo en los diferentes tratamientos, utilizando cuatro explantes por RITA, fueron llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 24 ± 2°C, un fotoperiodo de 16 h luz y 8h de oscuridad, en el caso de los RITA recibieron inmersiones de acuerdo al tiempo 1 (Figura 23).



**Figura 23.** Cultivo *in vitro* de los explantes de candelilla en sistemas de inmersión temporal (RITA).

Los datos fueron evaluados cada cinco días, tomando en cuenta las siguientes variables: Número de Brotes, Número de Nudos, Longitud del Brote, Ausencia o Presencia de Raíz, Ausencia o Presencia de Hiperhidricidad, Ausencia o Presencia de Callo, Oxidación y Contaminación.

### **3.8.5 Diseño experimental**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con tres repeticiones.

### **3.8.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## **3.9 CRECIMIENTO MÍNIMO**

### **3.9.1 Material vegetal**

El material vegetal de candelilla utilizado fueron explantes establecidos en condiciones *in vitro* con un tiempo de dos meses después de su establecimiento.

### **3.9.2 Tratamientos**

Para el ensayo de Crecimiento Mínimo fueron evaluados ocho tratamientos y dos testigos con 4 repeticiones por cada uno para su conservación *in vitro*. Para el protocolo de crecimiento mínimo se tomó como referencia tratamientos reportados en *Solanum tuberosum* (Ayala *et al.*, 2019). Los tratamientos utilizados se describen en la siguiente tabla (Cuadro 8):

**Cuadro 8.** Tratamientos evaluados para la conservación *in vitro* de candelilla en Crecimiento Mínimo.

Testigo 1	Testigo 2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
MS 100%	MS 100%	MS 100%	MS 50%						
		Manitol	Manitol	Manitol	Manitol	ASA	ASA	ASA	ASA
T1	T1	T2	T2	T2	T2	T1	T1	T1	T1
Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa
Antioxi ante “A”	Antioxi ante “A”	Antioxi dante							
T1 18 °C	T1 24 °C	“A” T1 18 °C	“A” T1 18 °C	“A” T1 24 °C	“A” T1 24 °C	“A” T1 18 °C	“A” T1 18 °C	“A” T1 24 °C	“A” T1 24 °C

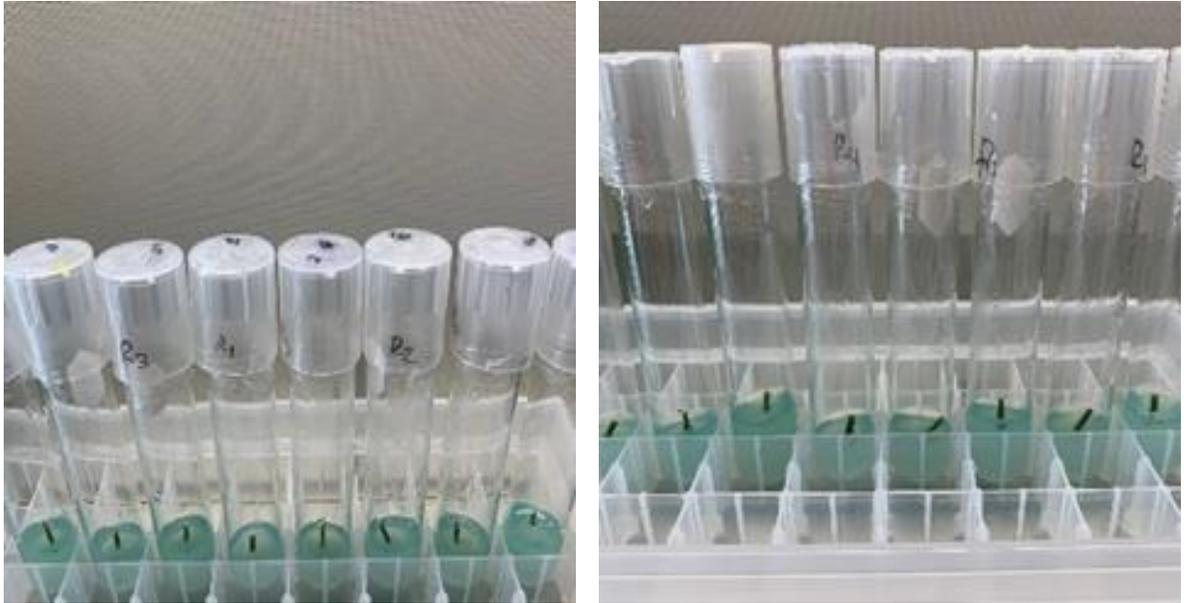
T = Tratamiento. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y fueron vertidos 10 ml de medio en cada tubo de vidrio.

### 3.9.3 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo por 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión a 121°C.

### 3.9.4 Cultivo *in vitro*

Como explantes para el cultivo *in vitro* se usaron meristemos apicales y yemas axilares de las plantas establecidas *in vitro* de candelilla anteriormente. Los explantes se obtuvieron mediante cortes rectos de 1 cm de longitud con un nudo por explante para su cultivo en los diferentes tratamientos utilizando un explante por tubo. El testigo 1 y los tratamientos 1, 2, 5 y 6 fueron llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 18 ± 2°C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, mientras que el testigo 2 y los tratamientos 3, 4, 7 y 8 fueron llevados a cámaras de incubación en condiciones controladas como: temperatura 24 ± 2°C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Figura 24).



**Figura 24.** Cultivo *in vitro* de los explantes de candelilla para su conservación en crecimiento mínimo.

Los datos fueron evaluados cada cinco días, tomando en cuenta las siguientes variables: Numero de Brotes, Numero de Nudos, Longitud del Brote, Ausencia o Presencia de Raíz, Oxidación y Contaminación.

### **3.9.5 Diseño experimental**

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con cuatro repeticiones.

### **3.9.6 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 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2016).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES

El análisis de varianza (Cuadro 9) mostró que los tratamientos tuvieron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en las cuatro variables de respuesta evaluadas. Se observó a los siete días, en la primera evaluación, los tratamientos ya demostraban diferencias altamente significativas las cuales se mantuvieron a los 15 días, lo que facilitó determinar cuál tratamiento fue el mejor para lograr un protocolo de desinfección exitoso que permitiera establecer la candelilla en condiciones *in vitro* para los ensayos posteriores.

Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de desinfección de candelilla (Cuadro 10). De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos en la comparación de medias Tukey (Cuadro 10), se obtuvo que el mejor tratamiento fue el Tratamiento 2 (Figura 25) con el porcentaje menor de contaminación y mayor supervivencia, con el cual se obtuvo el 90% de los explantes libres de patógenos.

Por otro lado, el testigo (Figura 26) y el Tratamiento 1 (Figura 27) mostraron mayor porcentaje de contaminación con un 100% de contaminación por hongos y por bacterias. Además, de una supervivencia nula de los explantes por lo que estos tratamientos fueron descartados en su totalidad.

**Cuadro 9.** Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de desinfección en candelilla.

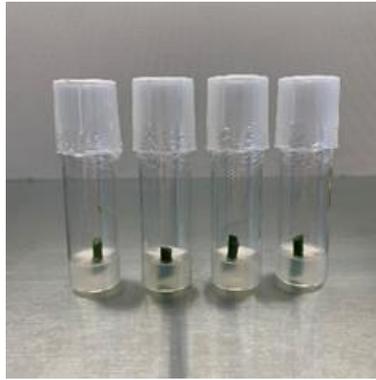
Fuentes de variación	Grados de libertad	Contaminación a los 7 días	Supervivencia los 7 días	Contaminación a los 15 días	Supervivencia a los 15 días
Tratamiento	2	3.0333 **	3.0333**	2.7000**	1.6333**
Error	27	0.0333	0.0333	0.0333	0.0777
Media		0.633	0.366	0.700	0.233

\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo.

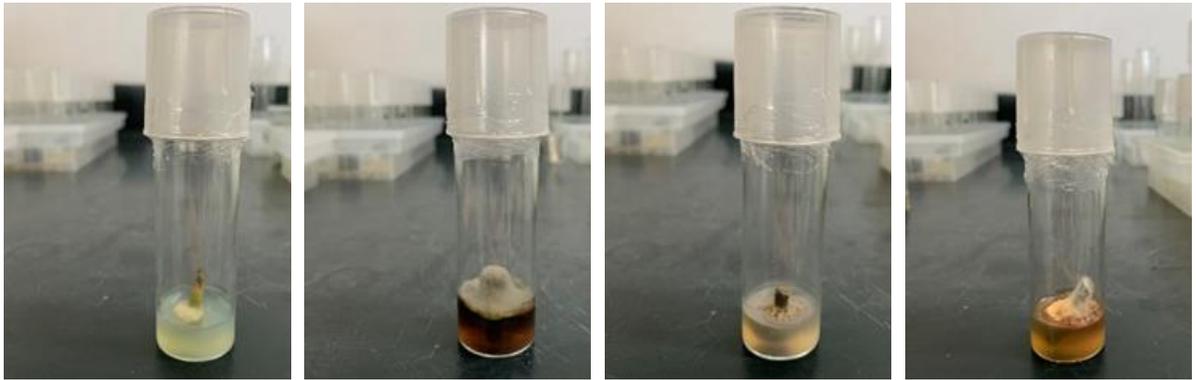
**Cuadro 10.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de desinfección de candelilla.

Tratamiento	Contaminación a los 7 días	Contaminación los 15 días	Supervivencia a los 7 días	Supervivencia a los 15 días
Testigo	1.0000 a	1.0000 a	0.0000 b	0.0000 b
Tratamiento 1	0.9000 a	1.0000 a	0.1000 b	0.0000 b
Tratamiento 2	0.0000 b	0.1000 b	1.0000 a	0.7000 a
DMS	0.2024	0.2024	0.2024	0.3092

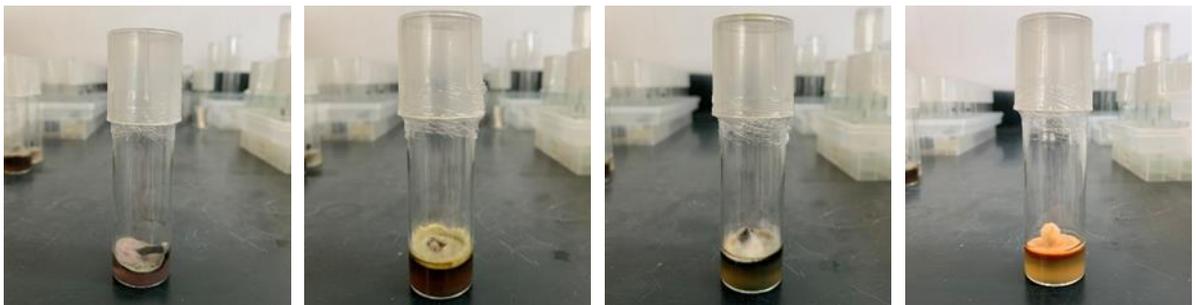
Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).



**Figura 25.** Explantes obtenidos con el tratamiento 2 de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.



**Figura 26.** Explantes contaminados del tratamiento testigo de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.



**Figura 27.** Explantes contaminados del tratamiento 1 de la evaluación final de la desinfección de los explantes de candelilla.

A pesar de que en estudios anteriores se reportó el uso de un protocolo muy similar difiriendo en el uso de Tween 20 a una concentración diferente, ya que en el estudio se reporta el uso de Tween 80 a una concentración distinta (Rodríguez, 2012), se obtuvo mayor éxito, debido a que con las buenas prácticas de laboratorio se consiguió el 100% de explantes asépticos.

## 4.2 ESTABLECIMIENTO

### Análisis Estadísticos

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 11) podemos observar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, pero, se observó que algunos tratamientos sobresalieron en algunas variables. Por lo que permitió, seleccionar el mejor tratamiento para el establecimiento de candelilla.

Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de establecimiento de candelilla. De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos en la comparación de medias Tukey (Cuadro 12), no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en ninguna de las variables evaluadas, pero hubo diferencias visibles, ya que, el tratamiento 1 demostró tener mejor respuesta que los demás, ya que se pudo observar que los explantes comenzaron a enraizar a pesar de estar en un medio de establecimiento sin reguladores de crecimiento.

**Cuadro 11.** Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos de establecimiento de candelilla.

Fuentes de variación	Grados de libertad	No. de Brotes	Oxidación	Contaminación
Tratamiento	5	0.4666 ns	0.3416 ns	0 ns
Error	18	0.5000	0.2361	0
Media		0.833	0.458	0

\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo.

**Cuadro 12.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de establecimiento de candelilla.

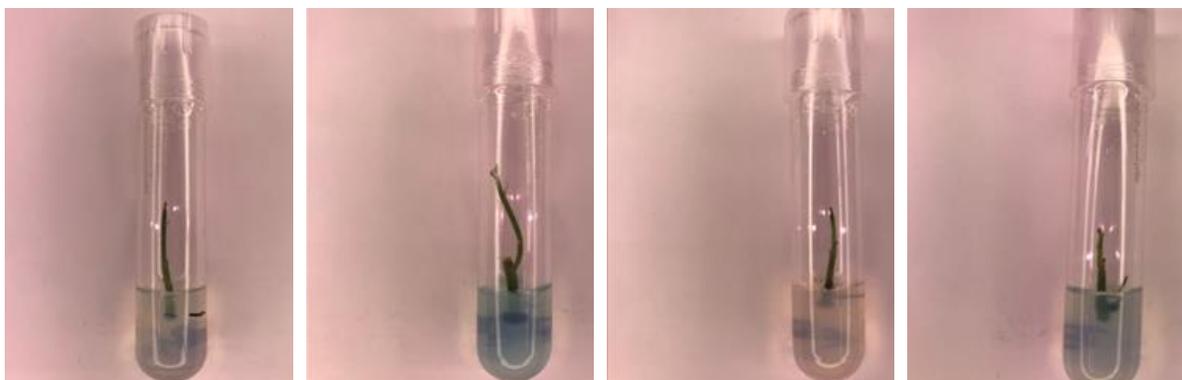
Tratamiento	No. de Brotes	Oxidación	Contaminación
Testigo	0.7500 a	0.5000 a	0 a
Tratamiento 1	1.2500 a	0.0000 a	0 a
Tratamiento 2	0.7500 a	0.7500 a	0 a
Tratamiento 3	1.2500 a	0.7500 a	0 a
Tratamiento 4	0.5000 a	0.2500 a	0 a
Tratamiento 5	0.5000 a	0.5000 a	0 a
DMS	1.5899	1.0919	0

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).



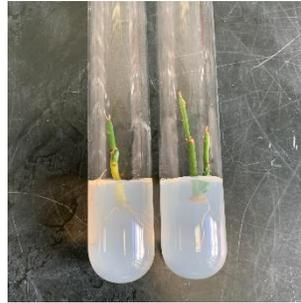
**Figura 28.** Explantes obtenidos del tratamiento testigo en la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla sin Antioxidante A.

En la Figura 28, se muestran los explantes obtenidos del testigo, en los que visiblemente se observa que empezó a secretar compuestos fenólicos debido a la coloración café que comenzó a expresarse el medio de cultivo, a pesar de que los explantes brotaron con el tiempo se comenzaron a oxidar.



**Figura 29.** Resultados obtenidos del Tratamiento 1 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.

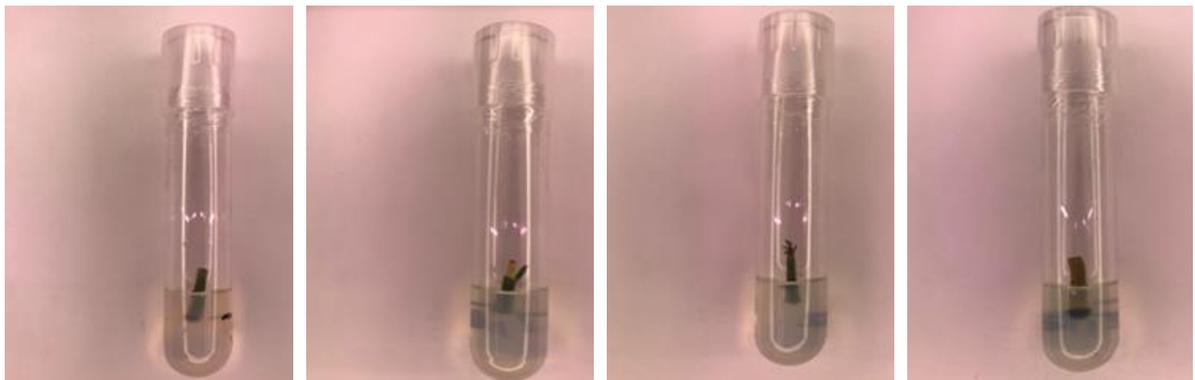
Por otra parte, en la Figura 29, se observa que los explantes brotaron, elongaron y no presentaron oxidación.



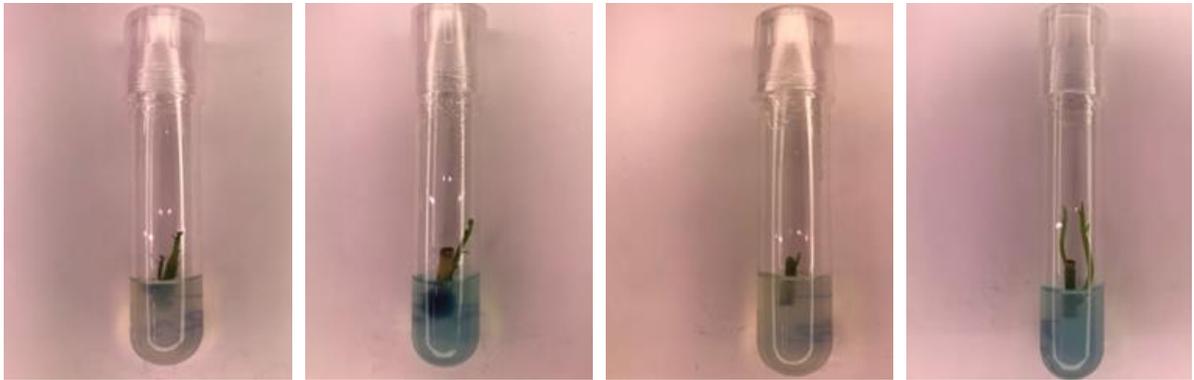
**Figura 30.** Explantes de candelilla enraizados en establecimiento en concentraciones del Tratamiento 1.

La Figura 30 muestra que en la concentración del Tratamiento 1, los explantes presentaron raíces a diferencia de los demás, lo que favoreció su elección como el mejor tratamiento para el establecimiento de candelilla.

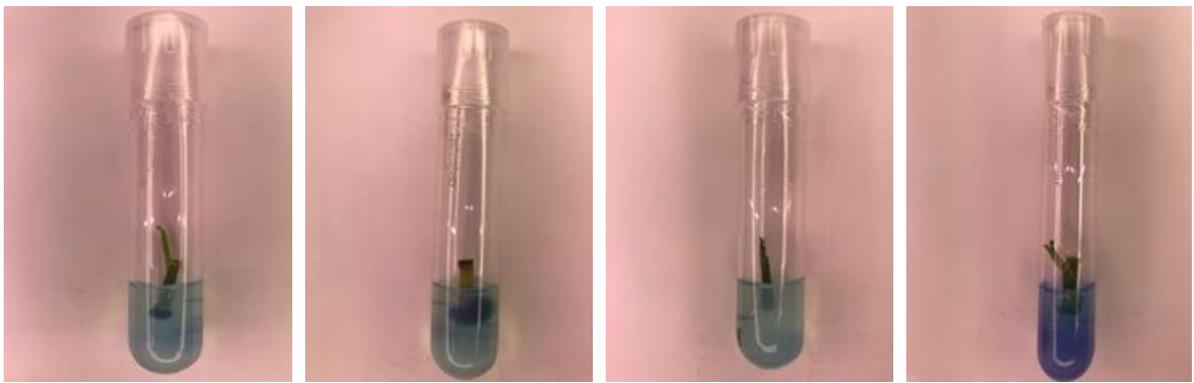
En las Figuras 31, 32, 33 y 34 muestran los explantes obtenidos de los tratamientos 2, 3 4 y 5.



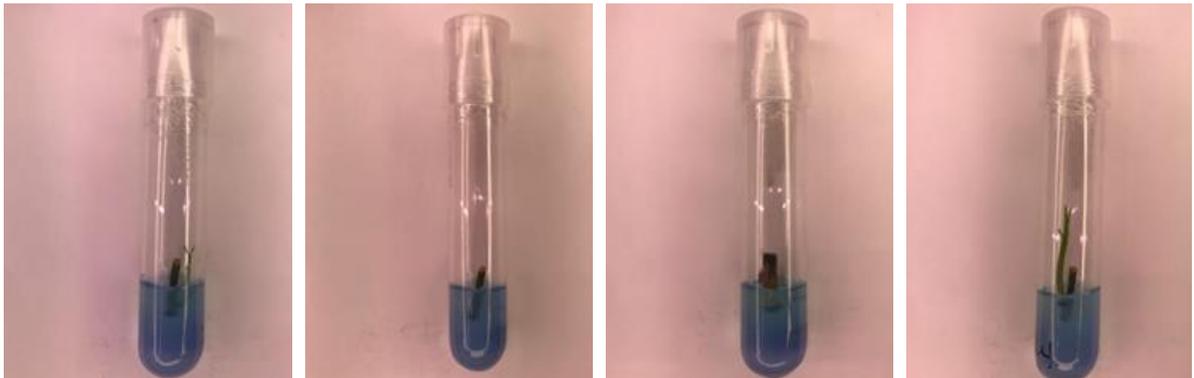
**Figura 31.** Resultados obtenidos del Tratamiento 2 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.



**Figura 32.** Resultados obtenidos del Tratamiento 3 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.



**Figura 33.** Resultados obtenidos del Tratamiento 4 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.



**Figura 34.** Resultados obtenidos del Tratamiento 5 de la evaluación final del establecimiento de los explantes de candelilla.

Las Figuras 31, 32, 33 y 34 muestran la brotación de los explantes, sin embargo, casi no elongaron, algunos se oxidaron y otros se secaron, lo que los hace tratamientos menos idóneos para establecer candelilla. Con base a los resultados obtenidos se observó que el mejor tratamiento fue el 1 a comparación de los demás a pesar de que no se encontraron

diferencias significativas entre estos. El tratamiento 1 mostró elongación de brotes, no hubo oxidación, probando así la capacidad antioxidante para estudios posteriores, no hubo contaminación y se observó la presencia de raíces.

La presencia de raíces en un medio sin reguladores se debe al estrés que sufren las plantas al disminuir la fuerza iónica del medio. La disminución de la fuerza iónica del medio se deriva de la reducción de las concentraciones de sales (García *et al*, 2015). En el caso de los tratamientos probados para el establecimiento de candelilla en ninguno se redujo la concentración de sales, por lo que se estima que el Antioxidante A, además de actuar como antifúngico y como antioxidante permite disminuir la fuerza iónica del medio, induciendo la presencia de raíces.

### 4.3 EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO EN LOS 3 EJIDOS (SAN JERÓNIMO, TORTUGA Y ESTANQUE DE LEÓN)

#### Análisis Estadísticos

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 13) los tratamientos mostraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en la variable respuesta de longitud del brote, mientras que en el resto de las variables no se presentaron diferencias significativas. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de establecimiento de los tres ejidos de candelilla. De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos en la comparación de medias Tukey (Cuadro 14), hubo diferencias estadísticas entre los ejidos, ya que el ejido Tortuga mostró menor elongación en sus brotes, mientras que el material del Ejido San Jerónimo mostró la mejor respuesta en la variable longitud del brote con 63.5 mm, seguido del ejido Estanque de León con 50.5 mm.

**Cuadro 13.** Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de establecimiento de candelilla con base a los tres ejidos de procedencia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	No. de Brotes	Longitud del brote	Oxidación	Contaminación
Tratamiento	2	0 ns	1233.0833**	0 ns	0 ns
Error	9	0	58.3055	0	0
Media		1.000	47.583	0	0

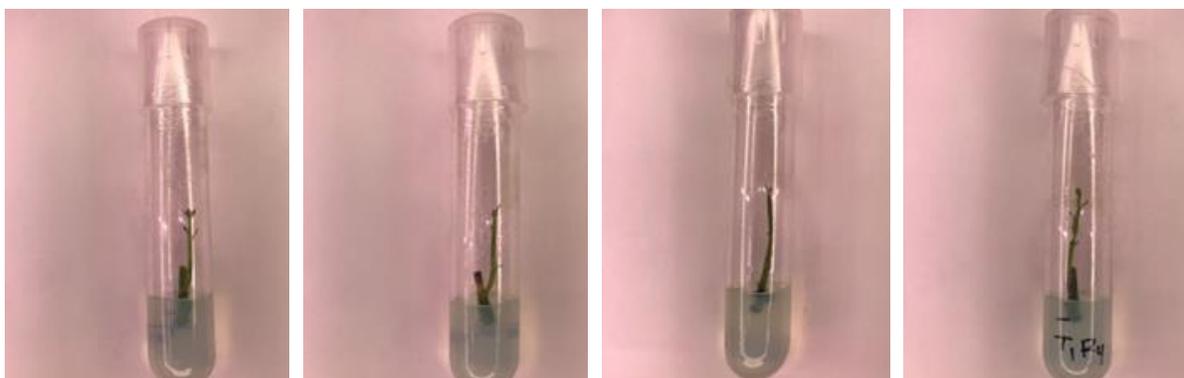
\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo.

**Cuadro 14.** Comparación de medias Tukey de la evaluación del establecimiento con base a los tres ejidos de procedencia.

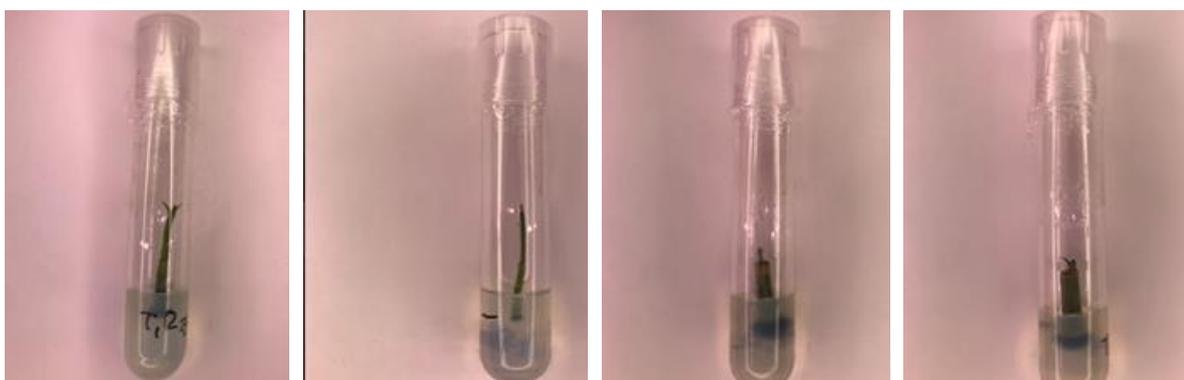
Ejidos	No. de Brotes	Longitud del brote (mm)	Oxidación	Contaminación
San Jerónimo	1.0000 a	63.5 a	0 a	0 a
Tortuga	1.0000 a	28.7 b	0 a	0 a
Estanque de León	1.0000 a	50.5 a	0 a	0 a
DMS	0	15.0755	0	0

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

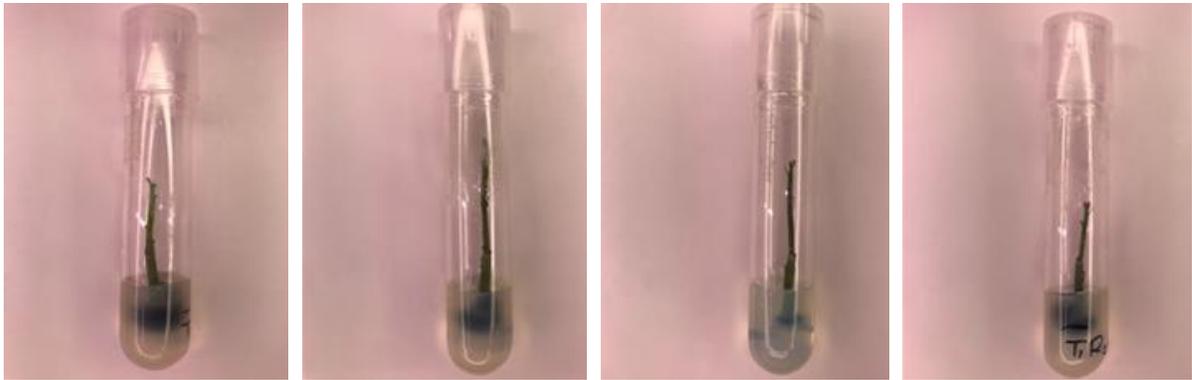
En las Figuras 35, 36 y 37 se muestran los explantes de los ejidos de procedencia.



**Figura 35.** Explantes del Ejido de San Jerónimo establecidos en cultivo *in vitro*.



**Figura 36.** Explantes del Ejido de Tortuga establecidos en cultivo *in vitro*.



**Figura 37.** Explantes del Ejiado de Estanque de León establecidos en cultivo *in vitro*.

En la Figura 35, se muestran los explantes procedentes del material del ejido de San Jerónimo, se observa que los explantes se lograron establecer sin oxidación y sin contaminación y la elongación de sus brotes fue buena en comparación con los explantes procedentes del material del ejido de Tortuga (Figura 36), el cual mostró menor elongación de los brotes en el cultivo de yemas axilares, y por último, se muestran los explantes procedentes del material del ejido de Estanque de León (Figura 37). Estos mostraron de igual manera una larga elongación de sus brotes, no existen diferencias estadísticas en el establecimiento *in vitro* de las plantas el ejido de San Jerónimo o el de Estanque de León es, por lo que en los demás ensayos realizados se utilizó candelilla establecida en cultivo *in vitro* del ejido San Jerónimo.

#### **4.4 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA**

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 15) los tratamientos mostraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en las variables respuesta de presencia o ausencia de callo y en la oxidación, mientras que en el resto de las variables no se presentaron diferencias significativas. En el Cuadro 15 se presentan los cuadrados medios y la significancia estadística de los tratamientos de establecimientos de multiplicación por organogénesis directa. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de multiplicación por organogénesis directa. De acuerdo al Cuadro 16 la comparación de medias Tukey mostró que los tratamientos tuvieron diferencias estadísticas en las variables respuesta de ausencia o presencia de callo y en la de oxidación. Por el

contrario, no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en las demás variables respuesta evaluadas. Sin embargo, se observaron diferencias entre la presencia de callos y de brotes.

**Cuadro 15.** Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de multiplicación por organogénesis directa de candelilla.

Fuentes de variación	Grados de libertad	No. de Brotes	No. de Nudos	Longitud	Ausencia o Presencia de Raíz	Ausencia o Presencia de Callo	Oxid.	Cont.
Tratamiento	3	2.9629 ns	17.8888 ns	62.9379 ns	0 ns	2.0000**	1.5833**	0.0370 ns
Error	32	2.1041	11.9166	45.49	0	0.0625	0.0902	0.0555
Media		0.777	1.833	4.096	0	0.666	0.305	0.0555

\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo.

**Cuadro 16.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de la multiplicación de candelilla por organogénesis directa.

Fuentes de variación	No. de Brotes	No. de Nudos	Longitud del brote (mm)	Ausencia o Presencia de Raíz	Ausencia o Presencia de Callo	Oxid.	Cont.
Testigo	0.1111 a	0.4444 a	1.0777 a	0 a	0.0000 c	0.8889 a	0.0000 a
Tratamiento1	0.5556 a	1.3333 a	3.6233 a	0 a	1.0000 a	0.0000 b	0.1111 a
Tratamiento2	1.4444 a	3.7788 a	7.5077 a	0 a	1.0000 a	0.0000 b	0.0000 a
Tratamiento3	1.0000 a	1.7788 a	4.1799 a	0 a	0.6667 b	0.3333 b	0.1111 a
DMS	1.852	4.409	8.614	0	0.319	0.383	0.301

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

En las Figuras 38, 39, 40 y 41 se muestra la presencia o ausencia de callos y de brotes en los tratamientos evaluados.



**Figura 38.** Explantes *in vitro* de candelilla del Testigo.



**Figura 39.** Explantes *in vitro* de candelilla del Tratamiento 1.



**Figura 40.** Explantes *in vitro* de candelilla del Tratamiento 2.



**Figura 41.** Explantes *in vitro* de candelilla del Tratamiento 3.

En la Figura 38 se muestran los resultados de la evaluación de la multiplicación por organogénesis directa del testigo en la cual solamente hubo un brote y el resto del material sufrió oxidación y necrosis. En la Figura 39 se muestran los resultados del Tratamiento 1, el cual generó mayor cantidad de callos que de brotes, mientras que en la Figura 40 los resultados obtenidos fueron favorables ya que hubo mayor cantidad de brotes que de callos, lo que lo hace un medio de cultivo idóneo para la multiplicación de candelilla, y por último

en la Figura 41 se muestra el Tratamiento 3, el cual tuvo los resultados menos favorables, ya que, casi no hubo brotes, ni callos, y presentó oxidación.

Para el protocolo de multiplicación por organogénesis directa se tomó como referencia tratamientos reportados por el INIFAP para la multiplicación de cactáceas del desierto de Chihuahua en los cuales se obtuvo éxito (Villavicencio *et al.*, 2011), esto para observar su eficiencia la candelilla. En el tratamiento en el cual obtuvimos éxito se utilizó un regulador de crecimiento de los mencionados en la investigación de Villavicencio *et al.*, 2011 en combinación del regulador de crecimiento IAA. Esta combinación de reguladores ha demostrado buenos resultados para la micropropagación *in vitro* en especies como *Solanum tuberosum* (Koleva *et al.*, 2014). En la planta de candelilla esta combinación de reguladores de crecimiento mostró multiplicación de yemas axilares, tanto de meristemos apicales, produciendo a su vez callos en la parte basal del explante.

#### 4.5 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE ORGANOGÉNESIS INDIRECTA

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 17) los tratamientos mostraron que no existen diferencias estadísticas ( $p \leq 0.01$ ) en las variables respuesta en los tratamientos de establecimientos de multiplicación por organogénesis indirecta. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de multiplicación por organogénesis directa. De acuerdo al Cuadro 18, la comparación de medias Tukey mostró que los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas en las variables respuesta evaluadas.

**Cuadro 17.** Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos evaluados para la multiplicación por organogénesis directa de candelilla.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Formación de callo	Oxidación	Contaminación
Tratamiento	3	0.3055 ns	0 ns	0.1111 ns
Error	8	0.2500	0	0.1666
Media		0.416	0	0.166

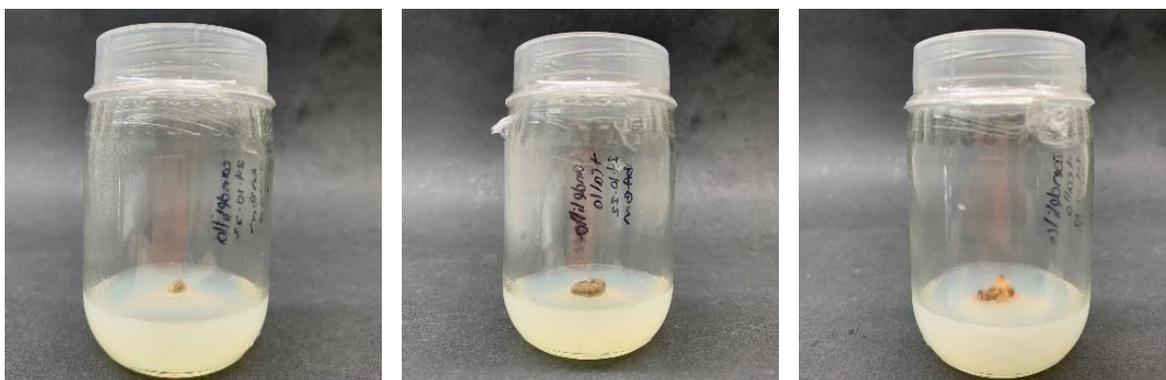
\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo

**Cuadro 18.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de multiplicación por medio de organogénesis indirecta para el aumento de masa caulinar.

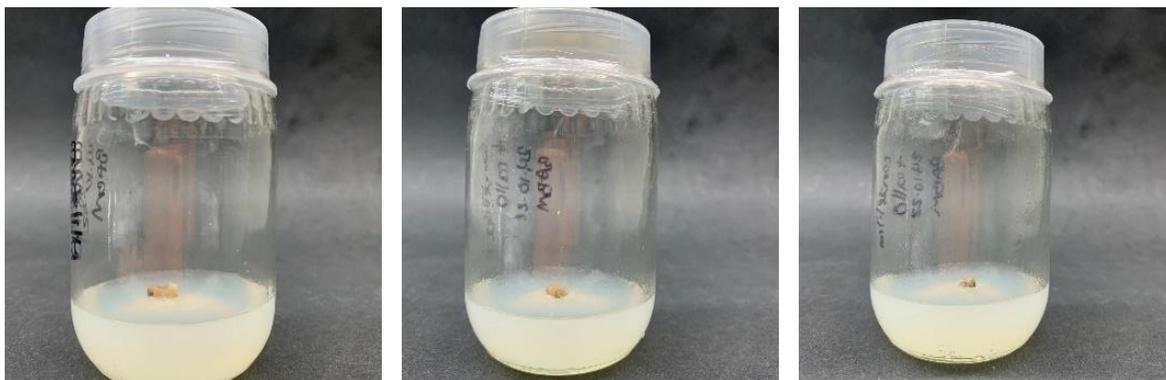
Tratamientos	Formación de callo	Oxidación	Contaminación
Testigo	0.0000 a	0 a	0.0000 a
Tratamiento 1	0.3333 a	0 a	0.3333 a
Tratamiento 2	0.6667 a	0 a	0.0000 a
Tratamiento 3	0.6667 a	0 a	0.3333 a
DMS	1.3073	0	1.0674

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

En las Figuras 42, 43, 44 y 45 se muestran los explantes obtenidos en los tratamientos evaluados en el establecimiento por organogénesis indirecta.



**Figura 42.** Callos de candelilla *in vitro*, Tratamiento Testigo.



**Figura 43.** Callos de candelilla *in vitro*, Tratamiento 1.



**Figura 44.** Callos de candelilla *in vitro*, Tratamiento 2.



**Figura 45.** Callos de candelilla *in vitro*, Tratamiento 3.

En la Figura 42 se muestran los explantes testigos en donde se observó que no hubo aumento de masa caulinar, pero si hubo oscurecimiento del tejido. Por otra parte, la Figura 43 muestra los explantes obtenidos con el Tratamiento 1, en el cual se pudo observar que no hubo aumento de masa caulinar e igual ocurrió algo de oscurecimiento, mientras que la Figura 44 muestra los explantes del Tratamiento 2, en el cual se puede observar que hubo un ligero aumento en la masa caulinar y el color de los callos cambió a tonos cafés y, por último, en la Figura 45 se muestra los explantes del Tratamiento 3, en el cual se puede observar que hubo mayor aumento de la masa caulinar y una coloración verde en los callos. Asimismo, se pudo observar que se presentó más contaminación en todos los tratamientos, sin embargo, se pudieron realizar las evaluaciones. El tratamiento 3 fue el que mostró la mejor respuesta; sin embargo, se recomienda realizar evaluaciones por un periodo de tiempo más largo y probar más tratamientos. Uno de los tratamientos a probar sería el reportado por Flores del Ángel, 2013, el cual menciona que se producen callos a partir de la combinación de los reguladores de crecimiento de IAA y BAP en su mayor concentración. Este tratamiento se probaría para aumentar la masa caulinar de los callos ya existentes.

## 4.6 DIFERENCIACIÓN DE CALLOS

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 19) los tratamientos mostraron que existen diferencias estadísticas ( $p \leq 0.01$ ) en la variable respuesta de oxidación. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de diferenciación de callos de candelilla. De acuerdo al Cuadro 20 la comparación de medias Tukey mostró que los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos, ni en ninguna de las variables respuesta evaluadas.

**Cuadro 19.** Cuadros medios y significancia estadística de los tratamientos evaluados en la diferenciación de callos.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Presencia o Ausencia de Callo	Oxidación	Presencia o Ausencia de brotes	Contaminación
Tratamiento	2	0 ns	0.4444**	0 ns	0.1111 ns
Error	6	0	0.1111	0	0.2222
Media		1.000	0.222	0	0.777

\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo

**Cuadro 20.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para la diferenciación de los callos.

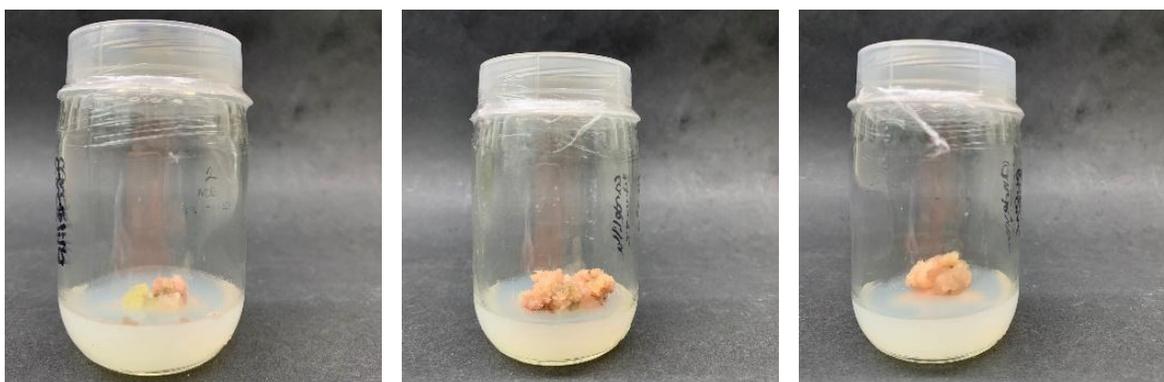
Tratamientos	Presencia o ausencia de callo	Oxidación	Presencia o ausencia de brotes	Contaminación
Testigo	1.0000 a	0.6667 a	0 a	0.6667 a
Tratamiento 1	1.0000 a	0.0000 a	0 a	1.0000 a
Tratamiento 2	1.0000 a	0.0000 a	0 a	0.6667 a
DMS	0	0.8351	0	1.181

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

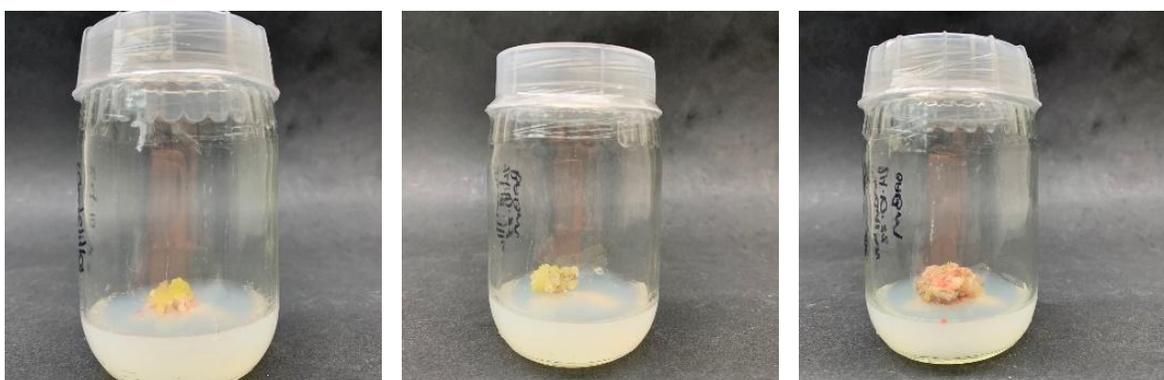
Las Figuras 46, 47 y 48 se muestran el efecto de los tratamientos evaluados en la diferenciación de callos.



**Figura 46.** Callo *in vitro* de candelilla, Tratamiento Testigo.



**Figura 47.** Callo *in vitro* de candelilla, Tratamiento 1.



**Figura 48.** Callo *in vitro* de candelilla, Tratamiento 2.

En la Figura 46 se muestran los callos evaluados con el testigo, en la cual se puede observar que no hubo diferenciación y se observó cambio en el color de los callos. La Figura 47 muestra que en los callos evaluados con el Tratamiento 1 no hubo diferenciación y existió más contaminación. Por último, en la Figura 48 se puede observar que en los callos evaluados con el Tratamiento 2 no mostraron diferenciación y se mantuvieron de color verdoso. Con base en los resultados anteriores, se recomienda esperar más tiempo y reevaluar para observar si pudiese llegar a ocurrir diferenciación de los callos de candelilla. Por su parte, Flores del Ángel (2013), reporta que obtuvo diferenciación de callos a las 8 semanas de su cultivo *in vitro* utilizando el mismo tratamiento que para la inducción de callos.

#### 4.7 MULTIPLICACIÓN POR MEDIO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (RITA)

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 21) se puede observar que los tratamientos mostraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) en las variables respuesta número de brotes y longitud del brote. Por el contrario, los tratamientos de multiplicación por medio de sistemas de inmersión temporal no mostraron diferencias significativas en las variables respuesta número de nudos, presencia o ausencia de raíz, presencia o ausencia de hiperhidricidad, presencia o ausencia de callo, oxidación y contaminación. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos de diferenciación de callos de candelilla. De acuerdo a la comparación de medias Tukey (Cuadro 22) el Tratamiento 2 tuvo la mejor respuesta en el número de brotes, muy superior a los demás tratamientos. Por el contrario, no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en las variables respuesta número de nudos, longitud del brote, presencia o ausencia de raíz, presencia o ausencia de hiperhidricidad, oxidación y contaminación.

**Cuadro 21.** Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de multiplicación por medio del sistemas de inmersión temporal RITA.

Fuentes de variación	Grados de libertad	No. de Brotes	No. de Nudos	Longitud del brote	P / A de Raíz	P / A de Hiperhidricidad	P / A de Callo	Oxid.	Cont.
Tratamiento	3	53.7777**	32.9722 ns	442.8345**	0 ns	0.3055 ns	0.444 4 ns	0 ns	0.111 1 ns
Error	8	3.0833	48.0000	139.4438	0	0.1666	0.1666	0	0.166 6
Media		5.000	11.083	17.784	0	0.250	0.333	0	0.166

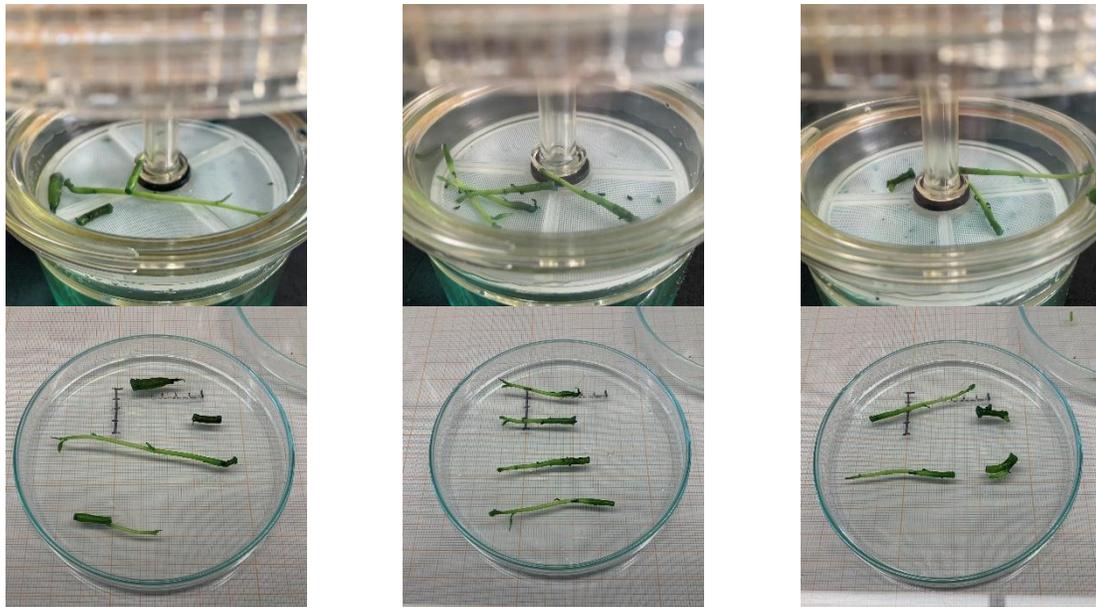
\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo

**Cuadro 22.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para la multiplicación en el sistemas de inmersión temporal RITA.

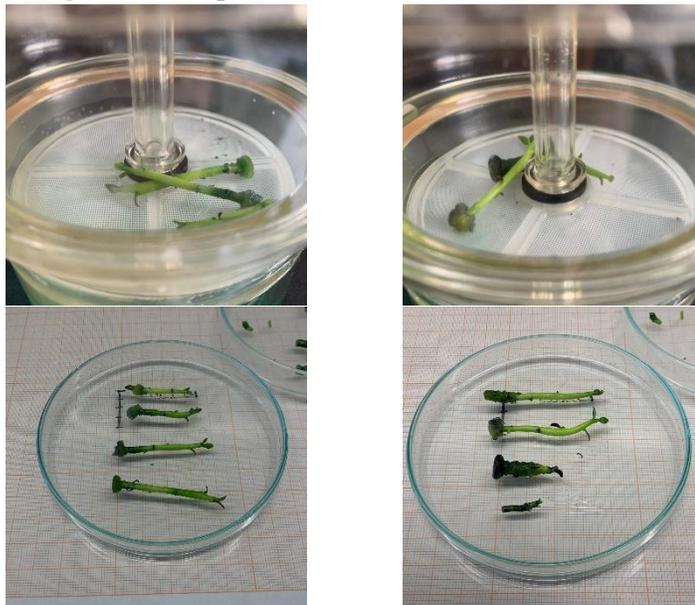
Tratamientos	No. de Brotes	No. de Nudos	Long. del brote	P / A de Raíz	P / A de Hiperhidricidad	P / A de Callo	Oxid.	Cont.
Testigo	3.333 b	11.667a	30.137 a	0 a	0.0000 a	0.0000 a	0 a	0.0000 a
Tratamiento1	2.667 b	14.000a	25.000 a	0 a	0.0000 a	0.6667 a	0 a	0.3333 a
Tratamiento2	11.33a	12.333a	12.833 a	0 a	0.3333 a	0.0000 a	0 a	0.0000 a
Tratamiento3	2.667 b	6.333a	3.167 a	0 a	0.6667 a	0.6667 a	0 a	0.3333 a
DMS	4.5912	18.115	30.876	0	1.0674	1.0674	0	1.0674

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

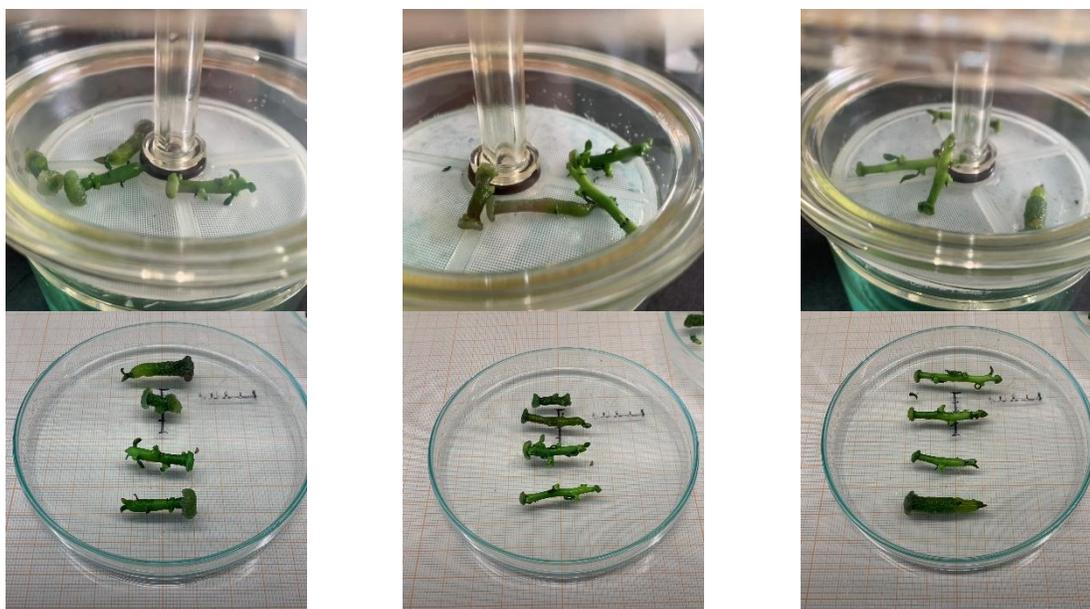
En las Figuras 49, 50, 51 y 52 se muestra la elongación de los explantes mediante los tratamientos de multiplicación por el sistema de inmersión temporal RITA.



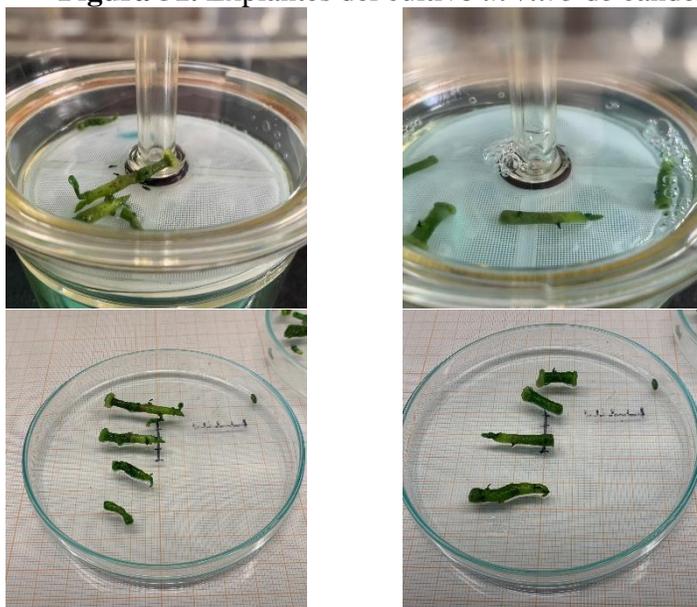
**Figura 49.** Explantes del cultivo *in vitro* de candelilla en SIT, tratamiento testigo.



**Figura 50.** Explantes del cultivo *in vitro* de candelilla en SIT, Tratamiento 1.



**Figura 51.** Explantes del cultivo *in vitro* de candelilla en SIT, Tratamiento 2.



**Figura 52.** Explantes del cultivo *in vitro* de candelilla en SIT, Tratamiento 3.

En la Figura 49 se muestran los explantes obtenidos con el testigo, los cuales mostraron una rápida respuesta de elongación, pero sin producir brotes adventicios. Por otro lado, en la Figura 50 se muestran los explantes obtenidos con el Tratamiento 1, los cual mostraron elongación del brote y producción de callos en la parte basal del explante, mientras que en la Figura 51, se muestran los explantes obtenidos del Tratamiento 2, en los cuales la elongación fue un poco menor, y no mostraron diferencias con respecto a los demás tratamientos. Además se generaron brotes adventicios y se produjeron callos en la parte basal. Por otro

lado, algunos de sus explantes se encontraban hiperhidratados. Por último, en la Figura 52 se muestran los explantes obtenidos del Tratamiento 3, en los cuales se generó callo y fue el tratamiento en el que menos elongaron dichos explantes.

#### 4.8 CRECIMIENTO MÍNIMO

De acuerdo al Cuadro 23, se puede observar que los tratamientos mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la longitud de los explantes. En contraste, los tratamientos evaluados no mostraron diferencias significativas en las variables respuesta número de brotes, número de nudos, presencia o ausencia de raíz, oxidación y contaminación. Además, se muestra el cuadro de comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para crecimiento mínimo. De acuerdo con la comparación de medias Tukey se mostraron diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la variable respuesta de longitud (Cuadro 24).

**Cuadro 23.** Cuadrados medios y significancia estadística de los tratamientos de crecimiento mínimo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	No. de Brotes	No. de Nudos	Longitud del brote (cm)	P / A de raíz	Oxidación	Contaminación
Tratamiento	9	0.3777 ns	5.0833 ns	64.9324*	0.0250 ns	0.1555 ns	0 ns
Error	30	0.2833	3.3416	26.0643	0.0250	0.1666	0
Media		0.550	2.575	13.616	0.0250	0.200	0

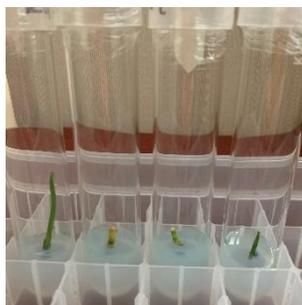
\*, \*\* = significativo con  $p \leq 0.05$  y con  $p \leq 0.01$ , respectivamente; ns = No significativo

**Cuadro 24.** Comparación de medias Tukey de la evaluación de los tratamientos para crecimiento mínimo.

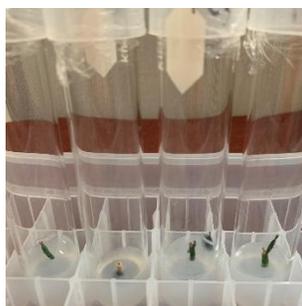
	No. de Brotes	No. de Nudos	Longitud Del brote (mm)	P / A de Raíz	Oxidación	Contaminación
Testigo 1	0.5000 a	3.750 a	18.295 ab	0.0000 a	1.0000 a	0 a
Testigo 2	0.5000 a	1.750 a	11.568 ab	0.0000 a	0.2500 a	0 a
Tratamiento 1	0.0000 a	1.750 a	10.283 b	0.0000 a	0.2500 a	0 a
Tratamiento 2	0.2500 a	2.500 a	10.093 b	0.0000 a	0.0000 a	0 a
Tratamiento 3	0.5000 a	2.750 a	12.158 ab	0.2500 a	0.5000 a	0 a
Tratamiento 4	0.5000 a	2.000 a	11.440 ab	0.0000 a	0.5000 a	0 a
Tratamiento 5	0.7500 a	2.000 a	13.480 ab	0.0000 a	0.2500 a	0 a
Tratamiento 6	1.0000 a	1.750 a	12.578 ab	0.0000 a	0.0000 a	0 a
Tratamiento 7	0.5000 a	2.250 a	13.250 ab	0.0000 a	0.2500 a	0 a
Tratamiento 8	1.0000 a	5.250 a	23.018 a	0.0000 a	0.0000 a	0 a
DMS	1.2839	4.4093	12.314	0.3814	0.9847	0

Diferencia Mínima Significativa DMS y Valores con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

En las Figuras 53, 54, y 55, se presentan los explantes de crecimiento mínimo obtenidos testigos y el mejor tratamiento de los ocho tratamientos evaluados.



**Figura 53.** Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, Tratamiento Testigo 1.



**Figura 54.** Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, Tratamiento Testigo 2.



**Figura 55.** Explantes obtenidos en crecimiento mínimo, tratamiento 2.

En la Figura 53 se muestran los explantes obtenidos con el testigo 1, en dicho testigo un explante elongó considerablemente su brote, otro no y dos se secaron, estos estuvieron incubados a 18 °C. Por otro lado, en la Figura 54 se muestran los explantes obtenidos del Testigo 2, con este testigo hubo brotes y un explante se secó, por lo que se consideró que no es candidato a seleccionarse, los explantes estuvieron incubados a 24 °C. La Figura 55 muestra los explantes obtenidos con el Tratamiento 2, con este tratamiento todos los explantes se mantuvieron de 1 cm y no hubo oxidación ni muerte de dichos explantes, estos se incubaron a 18 °C y se mantuvieron en crecimiento mínimo con un medio MS al 50%.

Los explantes obtenidos con los tratamientos 3 y 4 los cuales estuvieron incubados a 24 °C, con estos tratamientos hubo ligera elongación de los explantes, algunos murieron y se presentó oxidación en uno de ellos. Por otro lado, los explantes obtenidos con los tratamientos 5 y 6, respectivamente, dichos explantes se incubaron a 18 °C, y de igual manera que en los dos tratamientos anteriores hubo ligera elongación de sus brotes, también algunos explantes murieron y se presentó oxidación en uno de ellos. Por último, los explantes obtenidos de los tratamientos 7 y 8, respectivamente, se observa que los resultados no fueron favorables, hubo crecimiento de los brotes, y estos presentaron oxidación y algunos murieron.

## V. CONCLUSIONES

- El mejor método de desinfección para el establecimiento de los explantes de candelilla fue el método con periodos de tiempo más prolongados y con menores concentraciones de cloro.
- El Antioxidante A inhibió los compuestos fenólicos secretados por la planta de la candelilla y permitió su establecimiento exitosamente.
- El uso de IAA y BAP en concentraciones del Tratamiento 2 permitieron la multiplicación por organogénesis directa de los explantes de candelilla formando a la vez callos.
- Los tratamientos probados para el aumento de masa caulinar no mostraron los resultados esperados, por lo que no se logró aumentar el callo al tamaño deseado para su multiplicación.
- Los tratamientos probados para la diferenciación de los callos no mostraron los resultados esperados, sin embargo, el Tratamiento 2 muestra aún callos friables, se recomienda esperar más tiempo para poder evaluar y observar si comienza a diferenciarse.
- El Testigo y el Tratamiento 1 probados para la multiplicación en los sistemas de inmersión temporal mostraron buenos resultados, el testigo elongó sus tallos en un lapso corto por lo que resulta muy favorable, mientras que en el Tratamiento 1 se obtuvo la elongación de los brotes y a la par formación de callos.
- El uso de ácido salicílico no fue el mejor tratamiento para la conservación en crecimiento mínimo de la candelilla, mientras que el mejor tratamiento fue en donde se redujeron las sales al 50% y en donde se usó manitol.

## VI. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. (2007). La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en el norte de Zacatecas.
- Berrum, D. (2020). Caracterización fisicoquímica y funcional de la planta de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en diferentes localidades.  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/47642>
- Cabello Alvarado, V., Javier, C., Galindo, S., Bermúdez, B., Berumen, P., Orta, Á., & Garza, V. (2013). Cera de candelilla y sus aplicaciones. *Avances en química*, 8(2), 105–110. [www.saber.ula.ve/avancesenquimica](http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica)
- Canales, E. (2006). Candelilla, del desierto mexicano hacia el mundo.  
<https://cofemersimir.gob.mx/expediente/13817/mir/32651/archivo/910494>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*. <http://www.ainfo.inia.uy/>
- Castorena, M., Catalán, M., Inzunza, L., & Román, L. (2005). Conservación, aprovechamiento y comercialización.
- Cervantes M. (2005). Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México.
- CONABIO. (2008). Comisión Nacional para el Conocimiento. [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- CONAFOR. (2021). Candelilla, un valioso recurso natural no maderable.  
[https://www.gob.mx/conafor/articulos/candelilla-un-valioso-recurso-natural-no-maderable?idiom=es#:~:text=La%20planta%20de%20candelilla%20\(Euphorbia,extra cci%C3%B3n%20de%20la%20cera%20natural](https://www.gob.mx/conafor/articulos/candelilla-un-valioso-recurso-natural-no-maderable?idiom=es#:~:text=La%20planta%20de%20candelilla%20(Euphorbia,extra cci%C3%B3n%20de%20la%20cera%20natural)
- Corella Tituaña, R. J. (2021). Efecto antifúngico de la terapia fotodinámica sobre *Cándida albicans* con diferentes fotosensibilizadores: violeta de genciana al 0.01 % y azul de metileno al 0.01%.

- Daniela Ayala-Hernández, D., Rocío Ruiz-Saénz, D., Judith Cruz-Gutiérrez, E., & Antonio López-Delgado, H. (2019). Salicylic acid induces tolerance to cryogenic stress in *Solanum tuberosum*. In *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* (Vol. 10, Issue 7).
- Daorden, M. (2012). Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.
- Decimoctava reunión del Comité de Flora. (2009). EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE EUPHORBIA ANTISYPHILITICA EN MÉXICO.
- Flores Del Ángel, M. (2012). Morfología, viabilidad y germinación de semillas de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.).
- García-Águila, L., de Feria, M., Acosta, K., & para la correspondencia, A. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. In *Artículo Científico Biotecnología Vegetal* (Vol. 7, Issue 2).
- García-Beltrán, J., Gómez-Reyes, L., Pichardo-González, J., & Cruz-Gutiérrez, E. (2022). Establecimiento de *Magnolia dealbata* L. En condiciones *in vitro* para la inducción de la formación de callo. <http://reunionescientificas.inifap.gob.mx/>.
- Generalitat de Catalunya. (2020). Butlletí d'Antídots de Catalunya.
- INIFAP. (2005). El comercio internacional de candelilla. [www.intracen.org](http://www.intracen.org)
- Instituto de la Candelilla. (2013). La planta de Candelilla.
- López, G., Cano, J., Ramos-Díaz, A., & Uc, A. (2021). Alcances y perspectivas del área de biotecnología vegetal del CIATEJ en el Sureste.
- Lugo Espinosa, O., Arellano Ostoa, G., & Cote, D. H. (2017). Automation of a temporary immersion technique based on open platforms of hardware and software. [http://mx.omega.com/pptst/ELC\\_PLC.html](http://mx.omega.com/pptst/ELC_PLC.html);
- Martín, R., Chong-Pérez, B., Pérez-Alonso, N., & para la correspondencia, A. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. 15(4), 195–206.

- Maycotte-de la Peña, L., Robles-Parra, J. & Tafolla-Arellano, J. (2021). Prácticas para un desarrollo local sustentable en comunidades rurales candelilleras, el caso de dos ejidos de Coahuila, México. <http://revistaagraria.com/>
- Moran, M., & Jara, M. (2020). Bosques, desertificación y diversidad biológica. Desarrollo Sostenible.
- Mroginski, L. y R. W. (n.d.). Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro*. 1991.
- Ortiz Gimeno, M. del M. (2019). Efecto de la incorporación de ácidos fenólicos antimicrobianos en las propiedades de films de almidón de yuca.
- Protección de la Fauna Mexicana A.C. (2015). Estudio para el Programa de Desarrollo Comunitario.
- Rojas, R., Tafolla-Arellano, J. C., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2021). *Euphorbia antisyphilitica* Zucc: A source of phytochemicals with potential applications in industry. In *Plants* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–9). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/plants10010008>
- Rojas-Molina, R., Saucedo Pompa, S., De León Zapata, M., Jasso Cantú, D., & Aguilar, C. (2011). Pasado, presente y futuro de la candelilla.
- Rojas-Molina, R., Tafolla Arellano, J., & Martínez-Ávila, G. (2020). *Euphorbia antisyphilitica* Zucc: una fuente de fitoquímicos con aplicaciones potenciales en la industria.
- Santos, J., Iglesias, V., Santos-Suárez, J., Mangiagalli, M., Brocca, S., Pallarès, I., & Ventura, S. (2020). pH-Dependent Aggregation in Intrinsically Disordered Proteins Is Determined by Charge and Lipophilicity. *Cells*, 9(1).  
<https://doi.org/10.3390/cells9010145>
- SAS. (2016). SAS.

- Secretaría del Medio Ambiente. (2021). Especies Forestales Maderables y No Maderables Sujetas a Aprovechamiento.
- SEMARNAT. (2009). NORMA Oficial Mexicana NOM-018-RECNAT-1999.
- Urrea, A. I., Castrillón, P. A., & Monsalve, Z. (2009). *In vitro* propagation and tisular differentiation in *Lippia dulcis*. In Actual Biol (Vol. 31, Issue 90).
- Vilchez Perozo, J. A., & Albany de Vilchez, N. R. (2014). Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2), 96–103. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.42180>
- Vilchez, J., Albany, N., Martínez, L., Molina, M., Pirela, C., Molina, M., Alvarez, C., Chirinos, J., Profesor, \*, Magíster, A., & Vegetal, B. (2011). Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). In Rev. Colomb. Biotecnol (Vol. 1).
- Villa Castorena, M., Catalán Valencia, E., Izunza Ibarra, M., Román López, A., & Estrada Ávalos, J. (2008). Técnicas de producción de plantas de candelilla por semilla, estaca e hijuelos.
- Villavicencio, E., González, A., Carranza, M., & Arredondo, G. (2012). Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental del desierto chihuahuense.
- Villavicencio, E., González, E., Arredondo, A., Iracheta, L., Comparan, S., & Casique, R. (2011). Micropropagación de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactacea ornamental del desierto chihuahuense, en estatus de riesgo.