

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efecto de Diferentes Fitoreguladores en la Germinación y Multiplicación *in vitro* de  
*Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster.

Por:

**JOSÉ ABENAMAR JIMÉNEZ JIMÉNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2025.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Efecto de Diferentes Fitoreguladores en la Germinación y Multiplicación *in vitro* de  
*Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster.

**JOSÉ ABENAMAR JIMÉNEZ JIMÉNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada el Comité de Asesoría



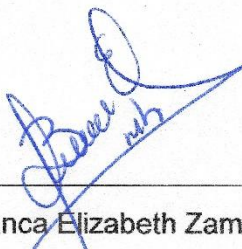
Dra. Aida Isabel Leal Robles

Asesor Principal



M.C. Eulalia Edith Villavicencio Gutierrez

Asesor Principal Externo



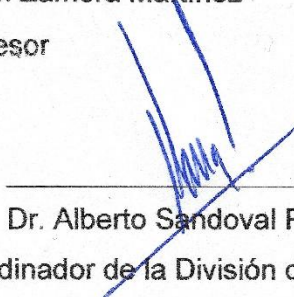
Dra. Blanca Elizabeth Zamora Martinez

Coasesor



M.C. Antonio Cano Pineda

Coasesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila México.



El presente estudio de tesis fue financiado con el proyecto SIGI: 1326457055 titulado: BANCO DE GERMOPLASMA DE CACTÁCEAS SALTILLO CIRNE-INIFAP a cargo de la M. C. Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez. Investigadora del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Saltillo.

## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo 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 las autoridades correspondientes. Por lo anterior, me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



José Abenamar Jiménez Jiménez

Firma y nombre

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN),** Agradezco profundamente por brindarme la oportunidad de formarme académicamente.

**Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),** Extiendo mi sincero agradecimiento por facilitar el espacio, los recursos, la orientación técnica y por todo el apoyo institucional recibido durante el desarrollo de este trabajo.

**A la M.C. Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez,** Deseo expresar mi más sincero y profundo agradecimiento, por su invaluable orientación, compromiso y paciencia a lo largo de todo este proceso. Su disposición constante para compartir su experiencia, conocimientos y consejos fue fundamental no solo en la planificación, ejecución y análisis de este proyecto, sino también en mi crecimiento personal y académico. Su apoyo incondicional, confianza y motivación constante fueron una fuente de inspiración, impulsándome a superar desafíos y a mantenerme siempre enfocado en la excelencia de este trabajo. Gracias por creer en mí y acompañarme en cada paso de este camino.

**A la Dra. Aida Isabel Leal Robles,** Le expreso mi más profundo agradecimiento por su orientación constante, paciencia y dedicación durante todo este proceso. Su apoyo y consejos fortalecieron y guiaron mi crecimiento académico y personal, Su disposición para acompañarme en cada paso y su motivación hicieron que este camino fuera enriquecedor.

**A la Dr. Blanca Elizabeth Zamora Martínez,** Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, por su invaluable apoyo, orientación y dedicación durante todo el desarrollo de esta investigación. Agradezco profundamente su paciencia, disposición y confianza.

**A mis padres,** Quiero expresarles mi más profundo agradecimiento por su amor y enseñanzas constantes. En especial, a mi madre, por su cariño paciencia y ejemplo de fortaleza. A pesar de la ausencia de apoyo y guía de mi padre, este logro refleja que los esfuerzos y aprendizajes se construyen con determinación propia; ojalá algún día pueda comprender la importancia de acompañar y motivar a quienes depende de uno. Su ejemplo me enseñó, aunque de manera inesperada que, la verdadera fortaleza nace de la perseverancia personal.

**A mis tíos** Josué Jiménez y Gladis Guzman, les expreso mi más profundo agradecimiento por su apoyo, cariño y ejemplo constante. Mi tío ha sido lo más cercano a una Figura paterna en mi vida, enseñándome el valor del trabajo, el respeto hacia los demás y, sobre todo, a valerme por mí mismo. Sus consejos, paciencia y guía me acompañaron en los momentos difíciles y me inspiraron a enfrentar los retos con determinación y responsabilidad. Su ejemplo y apoyo han dejado una huella imborrable en mi formación personal.

**A mi tía y a mi abuelita,** Noemí Jiménez y Manuela Ruiz les expreso mi más sincero agradecimiento por su cariño, apoyo incondicional y ejemplo de amor y fortaleza. Su presencia constante, palabras de aliento y afecto han sido un refugio y una fuente de motivación en los momentos más desafiantes. Gracias por enseñarme la importancia de la paciencia, la perseverancia y el amor familiar, valores que han acompañado cada paso de mi formación y que llevaré siempre conmigo.

**A mis amigos,** Carolina Curiel, Zdenko Arellano, Pamela Gonzales, Everardo Agüero, Fernando Loweree, Jorge Méndez, Carlos Rubio, Elvis Aguilar y Francisco Baños les expreso mi más sincero agradecimiento por su compañía, apoyo incondicional y momentos de alegría compartidos durante este camino académico. Su amistad, palabras de ánimo y disposición para acompañarme en los retos hicieron más llevadero cada obstáculo y celebraron conmigo cada logro. Gracias por enseñarme el valor de la solidaridad, la camaradería y el apoyo mutuo, y por recordarme que los verdaderos amigos son un pilar fundamental en la vida.

## **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis a mi familia, especialmente a mi madre, por su amor, paciencia y ejemplo de fortaleza; a mi tío y su esposa, por enseñarme el valor del trabajo, el respeto hacia los demás y a valirme por mí mismo; y a mi abuelita, por su cariño incondicional y apoyo constante, que fueron un refugio y fuente de motivación en los momentos más difíciles.

A mis amigos, por su compañía, ánimo y risas compartidas, que hicieron más llevadero cada desafío durante este camino académico.

Y a mis asesores y maestros, por su orientación, paciencia y sabiduría, que guiaron mis pasos y enriquecieron mi formación como estudiante y como persona.

A todos ustedes, gracias por ser pilares fundamentales que hicieron posible la culminación de este logro.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN DE NO PLAGIO.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
RESUMEN .....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
1.3 HIPOTÉISIS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Biología y Ecología de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> .....	3
2.1.1 Distribución y hábitat.....	3
2.1.2 Taxonomía.....	4
2.1.3 Características morfológicas.....	4
2.1.4 Raíces.....	4
2.1.5 Tallo .....	5
2.1.6 Tubérculos, areolas y espinas .....	5
2.1.7 Flores.....	6
2.1.8 Frutos y semillas .....	7
2.1.9 Ciclo de vida y reproducción .....	8
2.1.10 Amenazas .....	8
2.1.11 Importancia y usos de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> .....	9
2.2 Micropropagación <i>in vitro</i> .....	10
2.2.1 Concepto y aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> .....	10
2.2.2 Embriogénesis .....	10
2.2.3 Organogénesis.....	12
2.2.4 Fases de la micropropagación .....	13
2.2.5 Medios de cultivo en la micropropagación .....	14
2.2.6 Factores que afectan el cultivo <i>in vitro</i> .....	22



2.3 Bases biológicas de la germinación y multiplicación .....	23
2.3.1 La germinación de las semillas .....	23
2.3.2 Diferencias entre germinación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	23
2.3.3 Factores que afectan la germinación de las semillas.....	24
2.4 Micropropagación <i>in vitro</i> de cactáceas.....	25
2.4.1 Características específicas de las cactáceas.....	25
2.4.2 Tallo suculento .....	25
2.4.3 Espinas .....	26
2.4.4 Obtención de material vegetal y preparación de explantes.....	26
2.4.5 Métodos de esterilización.....	27
2.4.6 Inducción y mantenimiento de brotes.....	28
2.5 Beneficios de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Turbinicarpus valdezianu</i> .....	28
2.5.1 Conservación y aprovechamiento sostenible .....	28
2.5.2 Investigación y desarrollo tecnológico.....	29
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Ubicación geográfica del sitio experimental.....	30
3.2 Material vegetativo.....	30
3.3 Desinfección de semillas .....	30
3.3.1 Limpieza inicial de la semilla.....	31
3.3.2 Desinfección química .....	31
3.3.3 Enjuague estéril .....	31
3.3.4 Siembra.....	31
3.4 Ensayo de germinación <i>in vitro</i> .....	32
3.4.1 Diseño experimental .....	32
3.4.2 Modelo estadístico general .....	33
3.4.3 Variables dependientes.....	34
3.4.4 Análisis estadístico.....	34
3.5 Ensayo de multiplicación (Inducción de brotes).....	36
3.5.1 Diseño Experimental .....	36
3.5.2 Modelo estadístico .....	37
3.5.3 Variables dependientes.....	38
3.5.4 Análisis estadístico.....	38
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
4.1 Cinética de la germinación <i>in vitro</i> .....	39

4.1.1	Modelo de Cox.....	39
4.1.2	Mediana germinación (T50) .....	42
4.1.3	Tiempo medio de germinación (TMG).....	42
4.1.4	Área bajo la curva (AUC) .....	42
4.1.5	Prueba post-hoc.....	43
4.2	Análisis de varianza de las variables morfológicas de las vitroplantas.....	47
4.2.1	Pruebas de normalidad para altura vitroplanta y longitud de raíz ....	47
4.2.2	Efecto del tipo de medio (Factor A).....	49
4.2.3	Efecto de la presencia o ausencia de ácido giberélico (Factor B)....	52
4.2.4	Efecto combinado (interacción AxB).....	55
4.3	Ensayo de multiplicación (Inducción de brotes).....	60
4.3.1	Análisis de varianza Inducción de brotes .....	60
4.3.2	Pruebas de normalidad para número de brotes y altura de brotes ..	61
4.3.3	Efectos de los niveles de concentración (Factor A) .....	63
4.3.4	Efectos del tipo de Fitoregulador (Factor B).....	67
4.3.5	Efectos de la interacción de los Factores AxB .....	71
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1	Distribución de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (Fuente: elaboración propia con QGIS v.3.34, a partir de datos de Natural Earth).....3
2	Lamina botánica de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (H. Moeller) Glass & R. A. Foster. (modificada). (Fuente: Manual de Identificación CITES, <a href="http://checklist.cites.org/#/es">http://checklist.cites.org/#/es</a> ) .....5
3	Lámina botánica de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (H. Moeller) Glass & R. A. Foster (modificada). (Fuente: Manual de Identificación CITES, <a href="http://checklist.cites.org/#/es">http://checklist.cites.org/#/es</a> ) .....6
4	Botón floral (A) y flor (B) de <i>T. valdezianus</i> (H. Moeller) Glass & R. A. Foster. ....7
5	Fruto <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (H. Moeller) Glass & R. A. Foster.....7
6	Establecimiento de semillas de <i>T. valdezianus</i> en tubos de ensayo, con 10 mL de medio. ....32
7	Cinetica de germinación. Residuos de la prueba Schoenfeld del modelo Cox ( $p > 0.05$ ) (indica que no hay evidencia de violación del supuesto de proporcionalidad). ....41
8	Área bajo la curva del porcentaje acumulado de germinación (AUC) de <i>T. valdezianus</i> .....43
9	Comparación post-hoc del modelo de Cox ( $p > 0.05$ ) de los tratamientos evaluados en la germinación in vitro de <i>T. valdezianus</i> . (Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí).....44
10	Resultados de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor A composición del medio de cultivo en la germinación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación de la altura de las vitroplántulas; (B) longitud de la raíz. ....52

11	Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor B presencia o ausencia de $AG_3$ en la germinación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación de la altura de las plántulas; (B) longitud de la raíz. ....	55
12	Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para interacción Factores (A:B) en la germinación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación de la altura de las plántulas; (B) longitud de la raíz.....	59
13	Efecto de los cuatro tratamientos en el desarrollo morfológico de vitroplantas de <i>T. valdezianus</i> . (A) T1= 0.6% agar + 87.64 mM $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; (B) T2=0.6% agar + 87.64 mM $C_{12}H_{22}O_{11}$ + 8.65 $\mu M$ de ( $AG_3$ ); (C) T3= MS (Murashige-Skoog, 1962) al 50 %); (D) T4= MS 50% + 8.65 $\mu M$ de $AG_3$ . ....	60
14	Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor A concentración del medio de cultivo en la multiplicación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación en Numero de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al). ....	66
15	Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor B composición del medio de cultivo en la multiplicación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación en Numero de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al). ....	71
16	Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para la interaccion AxB en la multiplicación in vitro de <i>T. valdezianus</i> ; (A) comparación en Número de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al).....	76
17	Efecto de los tratamientos T1=(A), T2=(B), T3=(C) T4=(D) en la multiplicación in vitro de <i>T. valdezianus</i> . ....	77

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1	Composición de los tratamientos utilizados en la germinación in vitro de <i>T. valdezianus</i> . .....32
2	Composición de los tratamientos utilizados en la multiplicación de brotes.....37
3	Modelo de Cox para la germinación in vitro de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> . HR < 1 indica menor probabilidad relativa de germinar respecto al tratamiento 1, y HR > 1 indica mayor probabilidad. Ninguna diferencia fue significativa ( $p > 0.05$ ).....39
4	Índice de concordancia (C-index) y las pruebas de significancia global (Likelihood ratio, Wald y log-rank).....40
5	Métricas descriptivas de la germinación in vitro de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> por tratamiento. ....42
6	Resultados del análisis de varianza factorial (ANOVA 2x2) para las variables altura (Al) y longitud de raíz (Lr).....47
7	Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para las variables morfológicas altura (Al) y longitud de raíz (Lr). ....48
8	Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad para las variables transformadas.....48
9	Resultados del ANOVA factorial 2x2 para las variables morfológicas transformadas. ....49
10	Resultados del análisis de varianza factorial (ANOVA 2x2) para las variables numero de brotes (Nb) y altura de brotes (Al).....61
11	Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para numero de brotes (Nb) y altura de brotes (Al). ....62

12	Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para altura de brotes (AI).....	62
13	Resultados modelo ANOVA no paramétrico de rangos alineados (ART) para altura de brotes (AI).....	63

## RESUMEN

*Turbinicarpus valdezianus* es una cactácea amenazada que requiere protocolos eficientes de micropropagación para su conservación. La optimización de las fases de germinación y multiplicación es crucial para su propagación a escala.

El objetivo fue evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo y reguladores del crecimiento en la germinación y multiplicación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus* para establecer un protocolo optimizado.

Se realizaron experimentos factoriales para evaluar: 1) Germinación en diferentes medios (Agar/Sacarosa vs. MS al 50 %) con y sin AG<sub>3</sub>, analizada con regresión de Cox y métricas de velocidad (T50, TMG, AUG); 2) Analizar las variables morfológicas post-germinación (altura y longitud de raíz) mediante un ANOVA factorial 2x2 para determinar los efectos de la concentración y el tipo de regulador 3) Evaluar la multiplicación de brotes bajo un diseño factorial 2x2 evaluando el número de brotes y altura de brotes por explante con ANOVA y pruebas post-hoc.

La germinación fue alta (>95 %) y rápida (T50=14 días) en todos los tratamientos sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), indicando una alta viabilidad intrínseca de las semillas en contrates, en la fase de post-germinación, la combinación medio MS 50% + AG<sub>3</sub> (T4) promovió el mayor desarrollo de plántulas (altura y longitud radicular). Para la multiplicación, se identificó una interacción significativa ( $p > 0.01$ ), donde el tratamiento KIN + AIB a  $2.5+0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (T3) produjo el mayor número de brotes ( $8.36 \pm 2.45$ ), siendo significativamente superior a las demás combinaciones. La elongación de brotes fue favorecida principalmente por el uso de bajas concentraciones de reguladores.

En el cultivo *in vitro* la respuesta la respuesta morfogénica de *Turbinicarpus valdezianus* depende de la fase específica. Se establece un protocolo secuencial optimizado: germinación *in vitro* y crecimiento de vitroplántulas en medio MS 50% + AG<sub>3</sub>, y para la etapa de multiplicación un medio MS al 50 % adicionado con KIN+AIB ( $2.5 + 0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en baja concentración. Este protocolo representa una herramienta eficaz para la conservación y propagación masiva de esta especie.

**Palabras clave:** Propagación, reguladores del crecimiento, organogénesis, conservación ex situ.

## I. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son un género diverso de plantas que posee adaptaciones a ambientes áridos y semiáridos de los desiertos presentes en el continente americano, las cuales desempeñan un papel fundamental en este tipo de ecosistemas. La hostilidad ambiental propicia que algunas especies se desarrollen confinadas en pequeñas poblaciones con tasas bajas de regeneración natural, tal es el caso de *Turbinicarpus valdezianus*, especie de cactácea nativa y endémica, de México, en otras palabras, no existe naturalmente en ningún otro sitio del mundo, de importancia ecológica y ornamental, que en las últimas décadas ha enfrentado serios problemas de origen antropogénico, sumado a esto, su lento crecimiento y la baja germinación en condiciones naturales ponen en riesgo su supervivencia.

El cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta indispensable para la propagación masiva de plantas, permitiendo así el aprovechamiento sostenible y la conservación de especies como *T. valdezianus*. En este contexto el uso de reguladores del crecimiento vegetal es indispensables para la inducción de cambios bioquímicos y morfológicos, que influyen en el desarrollo de vitroplantas, inducción de brotes y raíces nuevas; sin embargo, las combinaciones y concentraciones adecuadas de estos reguladores siguen siendo una incógnita o están poco estudiados. Ante la necesidad de optimizar el medio de cultivo y seleccionar la correcta aplicación de fitoreguladores el objetivo de la presente investigación fue evaluar su efecto en la germinación y multiplicación para mejorar y efficientar el proceso de propagación *in vitro* de *T. valdezianus* y brindar información para futuros trabajos de investigación enfocados en la propagación de cactáceas *in vitro*.



## 1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal en la germinación y multiplicación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus*, con la finalidad de generar un protocolo de micropropagación optimizado, para la conservación y aprovechamiento de la especie.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el porcentaje de germinación, así como su cinética en diferentes medios de cultivo y tratamientos con fitoreguladores en cultivo *in vitro*.
- Determinar la influencia del medio de cultivo y fitorreguladores en el tamaño de las vitroplantas germinadas.
- Determinar el efecto de distintas concentraciones y combinaciones de fitoreguladores en la inducción y tamaño de los brotes en la multiplicación *in vitro*.

## 1.3 HIPÓTESIS

Se plantea que la respuesta de *Turbinicarpus valdezianus* al cultivo *in vitro* depende de la combinación y concentración de fitoreguladores empleada, siendo posible optimizar las fases de germinación y multiplicación mediante la selección adecuada del medio de cultivo y reguladores del crecimiento vegetal.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Biología y Ecología de *Turbinicarpus valdezianus*

#### 2.1.1 Distribución y hábitat

*Turbinicarpus valdezianus* es una especie endémica del noreste de México que habita en el desierto chihuahuense, una ecorregión árida y semiárida con regiones montañosas de gran extensión en México (Morafka, 2012; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Villavicencio Gutiérrez, 2010; Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2017).

Esta especie se distribuye principalmente en los estados de Coahuila, Nuevo León y San Luis Potosí, donde sus poblaciones se desarrollan en altitudes que van desde los 1,000 a 2,500 msnm, con una altitud promedio de 1491 msnm (Villavicencio Gutiérrez, 2010; Cruz-Reyes, 2015; Maurice y Maurice, 2017) (**Figura 1**). Por otro lado, es común encontrar a *T. valdezianus* en terrenos planos y en laderas con una rocosidad moderada y una pedregosidad que puede llegar a ser regular e incluso elevada (Cruz-Reyes, 2015).



**Figura 1.** Distribución de *Turbinicarpus valdezianus* (Fuente: elaboración propia con QGIS v.3.34, a partir de datos de Natural Earth).

### 2.1.2 Taxonomía

**Reino:** Plantae

**Filo:** Tracheophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Caryophyllales

**Familia:** Cactaceae

**Género:** *Turbinicarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb.

**Especie:** *Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller)  
Glass & R. A. Foster

### 2.1.3 Características morfológicas

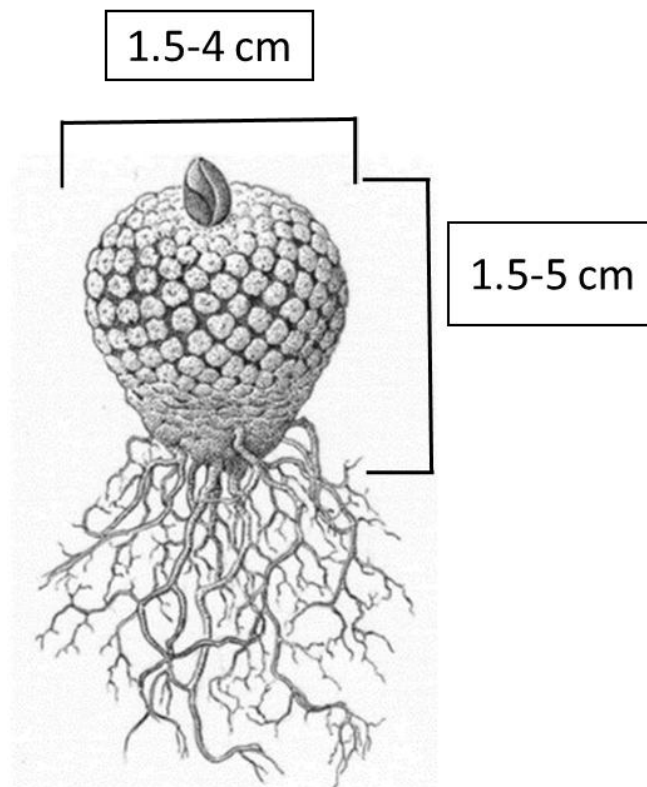
Su tamaño es pequeño, de forma globosa a cilíndrica, densamente cubierta por espinas blancas, plumosas suaves y flexibles poco punzantes y entrecruzadas, las cuales forman pequeñas sombrillas en las puntas de los tubérculos, este tipo de espinas, además de servir como defensa contra herbívoros, juega un papel crucial en la regulación de la temperatura de la planta y en la retención de humedad, al crear una microcapa de aire que reduce la pérdida de agua por evapotranspiración. La disposición pectinada también facilita el desvío de la luz solar intensa, aunado a eso, su forma y tamaño pequeño le permite la evitar la deshidratación excesiva al reducir el área de exposición directa al sol, estas adaptaciones son importantes para sobrevivir en su hábitat árido (Bravo *et al.*, 1991; Anderson, 2001; Mauseth, 2006) (**Figura 2**).

### 2.1.4 Raíces

Fibrosas a partir de la base subterránea elongada del tallo (**Figura 2**).

### 2.1.5 Tallo

Simple, globoso-depreso a cilíndrico, rara vez emerge más allá del nivel del suelo, con base del tallo elongada y subterránea, 1.5 a 5 cm de altura, y de 1.5 a 4 cm de diámetro, color verde glauco, verde-azulado, completamente cubierto por espinas (Figura 2).



**Figura 2. Lamina botánica de *Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster. (modificada). (Fuente: Manual de Identificación CITES, <http://checklist.cites.org/#/es>)**

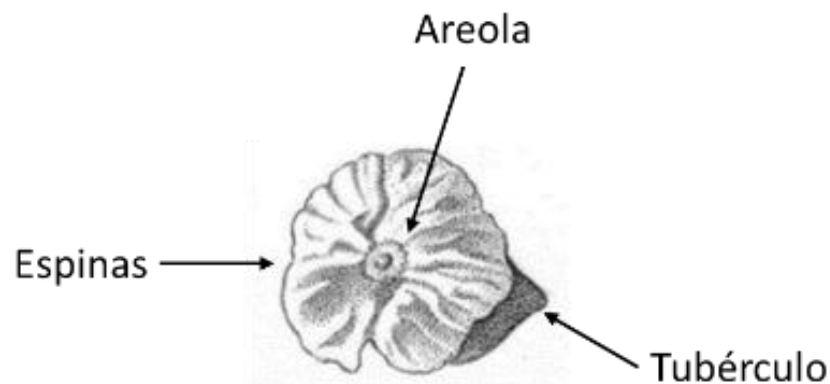
### 2.1.6 Tubérculos, areolas y espinas

Los tubérculos de esta cactácea presentan una disposición en espirales con series de 8 y 13. Son de color verde glauco, verde-azulado, de forma cónica con cuatro ángulos y miden aproximadamente entre 2 y 3 mm de largo (Bravo *et al.*, 1991).

Las areolas, ubicadas en la parte superior de cada tubérculo, son pequeñas y pueden variar de forma entre circular y elíptica de 1.5 a 2 mm de diámetro. Estas estructuras tienen una textura ligeramente leñosa lo que lo que ayuda a proteger el

punto de crecimiento de la planta y la zona de formación de espinas (Bravo *et al.*, 1991; Guzmán *et al.*, 2003; Mauseth, 2006).

Las espinas suelen ser de entre 20 y 30 por areola, con una longitud de 1.5 a 2 mm. Son notablemente leñosas finas, como pelos, plumosas y presentan una textura cetosa, de un color blanco que contrasta con el color de los tubérculos. Estas espinas están dispuestas horizontalmente y presentan un patrón pectiniforme, lo que ayuda a maximizar la protección de la planta sin bloquear completamente la luz solar (Bravo *et al.*, 1991) (**Figura 3**).



**Figura 3. Lámina botánica de *Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster (modificada). (Fuente: Manual de Identificación CITES, <http://checklist.cites.org/#/es>)**

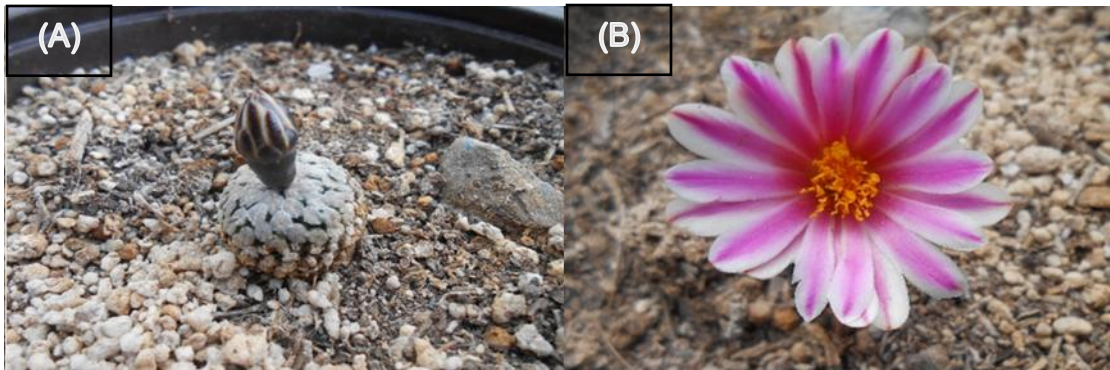
#### **2.1.7 Flores**

Las flores emergen de las areolas de los tubérculos jóvenes situados cerca del ápice de la planta. Tienen una forma infundibuliforme, es decir en forma de embudo, y mide entre 20 y 30 mm de largo.

El pericaropelo, la parte de la flor que rodea el ovario, es liso y mide unos 5 mm de diámetro. Los tépalos externos del perianto son de forma triangular, de color verde

oscuro con bordes blancos; mientras que los tépalos internos son de forma linear-lanceolados y de tonos violeta-rojizo, con la línea central más oscura y los bordes más claros (**Figura 4**).

Los estambres son numerosos y de un color rosa, lo que contrasta con las anteras de un amarillo oscuro. El estilo central es de color rojo y termina en un estigma con seis lóbulos de un tono verde amarillento. Al inicio el botón floral es de color café, notablemente ancho y con una punta truncada, pero conforme se desarrolla, adquiere una forma esférica que se vuelve ligeramente puntiagudas o subacuminada (Bravo *et al.*, 1991)



**Figura 4. Botón floral (A) y flor (B) de *T. valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster.**

#### **2.1.8 Frutos y semillas**

El fruto es de forma globosa, alcanzando aproximadamente 7 mm de diámetro al madurar. Su coloración varía desde tono rojo castaño hasta casi negro cuando está completamente desarrollado (**Figura 5**). Este fruto mantiene adheridos los restos del perianto, y se abre de manera longitudinal para liberar las semillas. Las semillas son pequeñas, de aproximadamente 1 mm de largo y tienen una forma piriforme, es decir, similar a una pera, presentan un hilo basal y una superficie tuberculada de color negro, lo que les otorga una textura rugosa (Bravo *et al.*, 1991; Guzmán *et al.*, 2003; Mauseth, 2006).

**Figura 5. Fruto *Turbinicarpus valdezianus* (H. Moeller) Glass & R. A. Foster.**



#### **2.1.9 Ciclo de vida y reproducción**

En las zonas áridas al presentarse periodos irregulares de lluvias y alta aridez, hacen que esta especie presente mecanismos de supervivencia como una germinación rápida en respuesta a las lluvias, una adaptación clave para sobrevivir en este tipo de hábitat (Mascot, 2020). Su crecimiento es de tipo indeterminado aprovecha las temperaturas más altas y la mayor disponibilidad de luz para desarrollarse, su floración se realiza a finales de la primavera o inicio del verano donde aparecen los botones florales, siguiendo un patrón influenciado por las condiciones ambientales como luz, temperatura y disponibilidad de agua (Bravo-Hollis *et al.*, 1991)

#### **2.1.10 Amenazas**

Desde hace décadas se tiene conocimiento de problemas complejos que ponen en grave riesgo la supervivencia de *T. valdezianus*. Conocida comúnmente como cono invertido de Valdez, principalmente por la fragmentación, transformación y pérdida del hábitat, así como la extracción ilegal, el cambio climático y la limitada área de distribución y baja densidad poblacional (Hernández-Oria *et al.*, 2007; Ballesteros-Barrera *et al.*, 2017; Huamaní-Sulca *et al.*, 2020)

Actividades antropogénicas como la agricultura, el crecimiento demográfico y la industria son los factores principales de la disminución en las áreas de distribución natural, esto ha llevado al declive de la especie en cuestión. Flores en 2001 reporto una densidad aproximada de diez plantas por metro cuadrado, mientras que en el

trabajo de Cruz-Reyes, 2006 hace mención de una reducción drástica a un individuo por cada 1.3 metros cuadrados, este último autor menciona que el estado de salud de las poblaciones es buena a pesar de la disminución, pero recalca que en un futuro no muy lejano poblaciones en Coahuila podrían desaparecer por su cercanía a áreas conurbanas.

Su rareza biológica también otro factor por el cual es amenazada y las fronteras mexicanas son dos de las regiones más importantes para la extracción ilegal y el tráfico de especies. Este es el caso de *T. valdezianus*, a pesar de que se encuentra registrada bajo protección en la NOM-059 y también fue incluida en el (CITES) en el apéndice I principalmente por su limitada distribución geográfica. (CITES, n.d.; WWF, n.d.)

#### **2.1.11 Importancia y usos de *Turbinicarpus valdezianus***

Esta cactácea genera un gran interés en los coleccionistas nacionales y extranjeros y en los viveristas dedicados a la producción de plantas de ornato, debido a las características morfológicas que presenta la planta, así como su color y lo llamativo de sus flores (García-Osuna *et al.*, 2011). Desde el punto de vista fitoquímico el género *Turbinicarpus* es uno de los de mayor interés, debido a que es una planta que produce diversos alcaloides con posibles aplicaciones médicas (Morales, 2014).



## **2.2 Micropropagación *in vitro***

### **2.2.1 Concepto y aplicaciones del cultivo *in vitro***

El conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* pertenece a un grupo de herramientas biotecnológicas indispensable para la producción masiva de plantas de interés económico, ya que permite la propagación de un genotipo en específico o el desarrollo de clones mejorados (Park, 2021). Se basa en la regeneración vegetal, este proceso permite la regeneración de una planta entera a partir de un órgano o tejido adulto (Ikeuchi *et al.*, 2019).

Este fenómeno se da gracias a la capacidad totipotente de las células vegetales, es decir la obtención de células indiferenciadas a partir de tejido diferenciado (hojas, raíz, tallo), que posteriormente se induce la rediferenciación a través de organogénesis directa o embriogénesis somática para la obtención de plantas adultas (Sarma *et al.*, 2023). Sin embargo, no todas las células vegetales tienen esta capacidad de manera natural, pero en condiciones adecuadas, algunas células pueden volverse totiponciales (Fehér, 2019). La función principal de este proceso es el remplazo de tejido, la renovación fisiológica o la reparación (Ikeuchi *et al.*, 2019).

### **2.2.2 Embriogénesis**

La obtención de una célula madre embrionaria totipotente a partir de una célula somática vegetal se le conoce como embriogénesis somática, las células pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos como son la dediferenciación celular, activación de la división celular, reprogramación fisiológica. Esto lugar a un embrión no cigótico que es capaz de producir plantas nuevas, este proceso es de suma importancia en la propagación asexual y también es una herramienta indispensable para la producción de semillas sintéticas, la conservación del germoplasma y la criopreservación (Yang y Zhang, 2010; Guan *et al.*, 2016; Gladfelter *et al.*, 2021; Saadat *et al.*, 2023).

El desarrollo de embriones partiendo de células somáticas se puede generar por lo menos de tres formas diferentes (Fehér, 2019).

### **2.2.2.1 Embriogénesis somática directa**

Se origina a partir de células aisladas con capacidad totipotente como las presentes en el tejido meristemático, esta es una forma de generar gran cantidad de embriones somáticos que pueden regenerar clones de plantas, se caracteriza por no pasar por la fase de callo (Pareek y Kothari, 2003; Fehér, 2019).

### **2.2.2.2 Embriogénesis indirecta**

Proceso de regeneración vegetal en el cual los embriones somáticos no se originan directamente a partir de células meristemáticas o totipotentes, sino que requieren una fase intermedia de formación de callo. Este callo está compuesto por células indiferenciadas que, bajo condiciones específicas, pueden ser inducidas a formar embriones somáticos (Fehér, 2019). Es un mecanismo frecuentemente utilizado en protocolos de cultivo *in vitro* debido a su alta plasticidad y capacidad de amplificación de material vegetal. A nivel molecular, la embriogénesis somática indirecta depende fuertemente de la expresión y regulación de factores de transcripción clave LEC1, LEC2, FUS3, BBM, AGL15. Estos genes forman parte de la red LAFL que regula el establecimiento de la identidad embrionaria y la transición desde células indiferenciadas hacia embriones somáticos, modificaciones en estos factores pueden alterar el desarrollo de directo a indirecto (Horstman *et al.*, 2017; Fehér, 2019).

### **2.2.2.3 Embriogénesis regulada por fitohormonas**

Implica la formación de embriones de grupos de células dependientes de gradientes de auxina y citoquinina, estas fitohormonas desempeñan roles fundamentales en la organización embrionaria y en el establecimiento de los centros organizadores de los meristemos a través de la regulación de genes como WOX11 que junto auxinas activan genes WUS y WOX5 (Fehér, 2019).

La adición equilibrada de hormonas vegetales como auxinas y citoquininas dan paso a la formación de una masa de tejido celular desordenado e indiferenciado denominado callo embriogénico, del cual se obtienen embriones somáticos capaces de regenerar plantas nuevas (Chandimali *et al.*, 2024; Woo *et al.*, 2021).

### **2.2.3 Organogénesis**

La organogénesis como su nombre lo indica es la capacidad de generar órganos nuevos a partir de tejido somático, este mecanismo proporciona valiosas herramientas para la propagación asexual de las plantas (Schwarz y Beaty, 2018). Se conocen dos vías de propagación por organogénesis una directa y otra indirecta en la regeneración directa se estimula el desarrollo de órganos nuevos a partir de explantes, esta vía ofrece una estabilidad genética en las plantas regeneradas, a diferencia de la vía indirecta la cual es propensa a generar variaciones somaclonales (Bansal *et al.*, 2024). En la vía indirecta se induce a la formación de una masa celular indiferenciada denominada “callo” que finalmente es estimulado para generar brotes nuevos (Valvekens *et al.*, 1988; George *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2021; Chandimali *et al.*, 2024).

A nivel molecular, este proceso está estrictamente regulado por factores de transcripción y gradientes hormonales, especialmente de auxinas y citoquininas, que influyen en la identidad celular y el patrón de desarrollo (Moubayidin *et al.*, 2009).

#### **2.2.3.1 Establecimiento de la competencia celular**

Las células somáticas deben adquirir capacidad para responder a señales morfogénicas. Esto ocurre por la expresión de genes como WUSCHEL (WUS): esencial para establecer y mantener células madre en el meristemo apical de brote. WOX5 (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5): regula la identidad de las células madre radicales. PLT1/2 (PLETHORA): determinan la identidad de raíces. La expresión de WUS es activada por la citoquinina y reprimida por auxinas, lo que genera un eje hormonal crucial para definir el destino de las células regenerantes (Zhai & Xu, 2021).

#### **2.2.3.2 Inducción y diferenciación de brotes o raíces**

Una vez que las células adquieren competencia, el equilibrio entre citoquinina y auxina determina el tipo de órgano que se formará. Alta citoquinina y baja auxina da paso a formación de brotes por el contrario alta auxina y baja citoquinina da paso a formación de raíces. Genes como CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1, CUC2)

regulan la separación de primordios y la formación de brotes laterales, mientras que STM (SHOOT MERISTEMLESS) colabora con WUS en la iniciación del meristemo del brote, el desarrollo de raíces en ambos tipos de regeneración pasa por cuatro fases; 1) Activación las células reciben un estímulo en presencia de auxina que activa el gen WOX11. 2) Iniciación WOX11 junto con auxina activan otros genes como WOX5 y LBD16, transformando las células en primordios de raíz. 3) Organización las células comienzan a organizarse para formar la punta de la raíz con su meristemo (centro de crecimiento). WOX5 se concentra en las células madre del meristemo. 4) Emergencia la raíz se desarrolla completamente y emerge del explante (Zhao *et al.*, 2008; Zhai y Xu, 2021).

#### **2.2.3.3 Reprogramación Epigenética**

Genes como AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) y BBM (BABY BOOM) están involucrados en la reprogramación y determinación celular. Además, enzimas como histona desacetilasas (HDACs) o metilasas regulan la accesibilidad de genes clave al transcripto (Nowak *et al.*, 2020).

#### **2.2.3.4 Interacción hormonal y red de transcripción**

La organogénesis está integrada por una red compleja en la que genes reguladores del desarrollo interactúan con rutas hormonales. Por ejemplo, ARRs (Arabidopsis Response Regulators) regulan la señalización de citoquinina, por su parte ARFs (Auxin Response Factors) junto a (Aux/IAA) regula la transducción de auxina, afectando directamente los genes de destino. Estos elementos permiten una precisa coordinación espacial y temporal del desarrollo organogénico (Su *et al.*, 2011).

#### **2.2.4 Fases de la micropropagación**

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo de *in vitro* se trata del cultivo de células, órganos, protoplastos o semillas, en un medio nutritivo, en condiciones asépticas y con las condiciones ambientales controladas ideales para su desarrollo (Bridgen *et al.*, 2018). El proceso cultivo *in vitro* consta de al menos 5 etapas como son: (I) Preparación y selección del material vegetal; (II) Establecimiento del material vegetal al medio de cultivo; (III) Multiplicación; (IV) Establecimiento de plántulas, elongación y enraizamiento; (V) Aclimatación.

Básicamente, el paso (I) consiste en la selección del material vegetal ya sea tejido vegetal o semilla.

En el paso (II) el material vegetal se coloca en un medio nutritivo para promover el crecimiento inicial, siendo fundamental el uso de condiciones asépticas.

Para el paso (III) la multiplicación se basa en el uso de reguladores de crecimiento para inducir la formación de brotes o callos, logrando un aumento en la cantidad de material vegetal disponible.

En el paso (IV) los brotes generados durante la multiplicación se subcultivan en medios donde desarrollan raíces y se fortalecen como plántulas completas listas para el siguiente paso.

Es la etapa final (V) en la que las plantas son gradualmente adaptadas a las condiciones ambientales externas para asegurar su supervivencia fuera del entorno *in vitro*.

Estos pasos son descritos ampliamente en la literatura científica y son fundamentales al momento de asegurar una alta tasa de éxito en la regeneración y adaptación de las plántulas (Thorpe, 2007; George *et al.*, 2008; Bridgen *et al.*, 2018).

### **2.2.5 Medios de cultivo en la micropropagación**

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permite el desarrollo de nuevas plantas a partir de células aisladas o fragmentos de tejido vegetal (Saad y Elshahed, 2012; Mondino, 2009). La composición del medio de cultivo es fundamental para el cultivo *in vitro*, ya que permite que los explantes obtengan los nutrientes esenciales que impulsan el crecimiento, la diferenciación y la regeneración de planta (Mohamed *et al.*, 2022). Por esta misma cuestión es que la nutrición óptima es una de las claves para el éxito del cultivo de tejidos (Bevan *et al.*, 2021).

Uno de los medios de cultivo pioneros en el cultivo de tejidos vegetales fue el medio de White (White, 1943). En la actualidad existen diferentes tipos de medios de cultivo como son el “B5” o Medio de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968). El Medio de Schenk y Hildebrandt o SH (Schenk & Hildebrandt, 1972). Y el “Wood Plant Medium”

o WPM (Lloyd & McCown, 1981). Sin embargo, el “MS” (Murashige y Skoog, 1962) cuya fórmula es N-K-Cl-Ca-S-Mg-P-Fe-Mn-B-Zn-Mo-Cu-Co y con una relación N:P 40:1. Es uno de los medios más utilizados debido a que posee gran versatilidad y eficacia al momento de propagar diferentes especies vegetales (Hameg *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2022).

Para que un medio de cultivo permita el desarrollo de nuevas plántulas debe contener nutrientes minerales. Estos minerales en el medio de cultivo se pueden dividir en cuatro grupos principales los cuales son macronutrientes principales (N, P, K), macros menores (Ca, Mg, S), Macros mediadas (Fe), y micros (Mn, B, Mo, Zn, I, Cu, Co), estos elementos son fundamentales para procesos metabólicos clave como son la síntesis de proteínas, fotosíntesis y la respiración (Kumar *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2021).

#### **2.2.5.1 Fuente de carbón**

El carbono actúa como una fuente de energía y carbono estructural, es un componente principal de casi todas las macromoléculas de organismo vegetal (Mohamed *et al.*, 2022; Pasternak *et al.*, 2023). En la naturaleza la glucosa es la fuente de carbono que más utilizan las plantas, pero en el cultivo *in vitro* supone ciertos retos, como es su conversión en ácido láctico debido a su inestabilidad a pH 5,6 y este proceso se cataliza a alta presión y temperatura (Leitzen *et al.*, 2021).

La sacarosa es ampliamente utilizada como fuente de carbono en el cultivo *in vitro* debido a su facilidad de asimilación y la presencia natural en la savia flemática de las plantas, también juega un papel crucial en el metabolismo y la diferenciación celular. Por el contrario de la glucosa, la sacarosa es relativamente resistente al proceso de esterilización por autoclave, pero puede cristalizar después de un tiempo prolongado. Además, su adición en concentraciones que van de entre el 2-3% ha demostrado aumentar la acumulación de metabolitos secundarios y promover el desarrollo celular en diversos sistemas de cultivo vegetal como raíces y brotes adventicios (Gago *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2023).

### **2.2.5.2 Macronutrientes**

Después del carbono, el elemento mineral cuantitativamente más importante es el nitrógeno ya que juega un papel clave en la síntesis de aminoácidos y proteínas, también forma parte de la de molécula de clorofila, cuya presencia es indispensable en el proceso de fotosíntesis (Shrivastav *et al.*, 2020).

El fósforo es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas siendo indispensable en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos. Es un macronutriente que forma parte integral de moléculas clave como son los ácidos Nucleicos, proteínas, fosfolípidos y el ATP, es elemental para el almacenamiento y la transferencia de energía (ATP) en las células vegetales y la formación de estructuras celulares. Su presencia es importante para la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de azúcares, la división celular y el crecimiento de raíces (Chen *et al.*, 2023).

El potasio no es un elemento estructural, pero desempeña un papel crucial en el desarrollo de las plantas ya que facilita la síntesis y transporte de azúcares en la planta, promoviendo un desarrollo equilibrado y el almacenamiento de energía también es cofactor en la activación de enzimas esenciales para procesos metabólicos clave, contribuye a la regulación osmótica y al equilibrio iónico, además de reforzar las defensas antioxidantes de la planta frente al daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hasanuzzaman *et al.*, 2018)

El calcio es importante desempeña múltiples funciones, actúa como un componente estructural, mensajero secundario y transductor de señales involucradas en la regulación de muchas quinasas para la estabilidad de las paredes celulares y la señalización intracelular (Lonergan *et al.*, 1968; Askari y Ghahremani, 2023). El calcio es necesario en la estabilidad de las paredes celulares y las membranas ya que participa en la formación de pectato de calcio, este último es el que brinda rigidez e integridad a las paredes y membranas celulares (Thor, 2019; Negi *et al.*, 2023). También regula procesos como la germinación de las semillas y la respuesta a estímulos bióticos y abióticos, frente al estrés produce las “señales de calcio” que consta de los incrementos transitorios en la concentración de calcio citosólico, esto

activa proteínas como las calmodulinas y las quinasas que dependen del calcio (Thor, 2019; Negi *et al.*, 2023).

El magnesio es otro macroelemento secundario que participa en el metabolismo vegetal, desempeñando funciones clave en procesos fotosintéticos incluyendo la síntesis de clorofila, el transporte de fotoasimilados y la fijación de carbono. Además, interviene en procesos respiratorios y en la síntesis de ADN y ARN (Cakmak y Kirkby, 2008; Farhat *et al.*, 2016; Yamagami *et al.*, 2021; Ishfaq *et al.*, 2022). Una de sus principales funciones es su papel estructural en la molécula de clorofila, donde actúa como el átomo central, permitiendo la absorción de luz durante la fotosíntesis. Este elemento es responsable del característico color verde de las hojas y de la captación de energía lumínica para la producción de fotoasimilados (Michael, 1941; Dorenstouter, 1985; Cowan, 2002). Además de su papel estructural, el Mg actúa como un cofactor enzimático indispensable en más de 300 reacciones bioquímicas, muchas de ellas relacionadas con la fijación de carbono en la fotosíntesis. Por ejemplo, regula la actividad de enzimas clave como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO) y el fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, ambas fundamentales en la asimilación de carbono en plantas  $C_3$  y  $C_4$  (Schneider, 1992).

El magnesio (Mg) también desempeña un papel esencial en la regulación iónica dentro de la célula vegetal. Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  influyen en el transporte de iones a través de las membranas de cloroplastos y vacuolas, lo que afecta directamente el equilibrio osmótico y el metabolismo celular (Shaul, 2002; Inoue *et al.*, 2022). Además, este ion participa en la apertura y cierre de las estomas en respuesta a la luz, regulando la transpiración y la eficiencia en el uso del agua (Shaul, 2002).

A nivel estructural, el  $Mg^{2+}$  se caracteriza por su disposición octaédrica y su alta afinidad por ligandos donadores de oxígeno o agua. Su carga divalente le permite interactuar con grupos fosfato con carga negativa, lo que facilita su participación en reacciones enzimáticas clave como la fosforilación de ATP y la actividad de la isocitrato liasa (Sreedhara y Cowan, 2002). Asimismo, este ion es esencial para el



correcto plegamiento del ARNr al neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato, lo que garantiza la estabilidad estructural de los ribosomas y la síntesis eficiente de proteínas (Yamagami *et al.*, 2021).

El azufre es un elemento estructural de los enlaces disulfuro de proteínas, vitaminas y cofactores (Narayan *et al.*, 2022). Tiene un rol imprescindible en el crecimiento y desarrollo de las células vegetales; abarca diversos procesos que van desde la fotosíntesis (transporte, estructura y regulación de electrones) como hasta el metabolismo del carbono y nitrógeno (Capaldi *et al.*, 2015). Las plantas sintetizan diversos compuestos azufrados como mecanismo esencial en respuesta al estrés, ya sean provocadas por agentes bióticos o abióticos. Entre estos destacan el azufre elemental, el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el glutatión (antioxidante clave), las fitocelatinas (quelantes de metales tóxicos), proteínas ricas en azufre y metabolitos secundarios específicos (Kopriva y Takahashi, 2019). La carencia de azufre, deteriora procesos vitales en las plantas: desde su desarrollo y crecimiento hasta la capacidad de enfrentar patógenos (estrés biótico) y condiciones ambientales adversas (estrés abiótico), lo que se traduce en una disminución significativa de su productividad (Capaldi *et al.*, 2015; Kopriva y Takahashi, 2019).

#### **2.2.5.3 Micronutrientes**

Estos son requeridos por las plantas en cantidades muy pequeñas tanto que algunos de ellos son denominados elementos traza, el Boro (B), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Zinc (Zn) aunque son requeridos en bajas cantidades, son imprescindibles para el metabolismo de las plantas, el desarrollo reproductivo, la regulación de nutrientes, la síntesis de clorofila, la producción de azúcares y desarrollo de frutos y semillas. Los micronutrientes en proporciones adecuadas promueven buena salud en las plantas, pero su deficiencia genera plantas anormales, por otra parte, también pueden ser tóxicos en elevadas cantidades (Sharma, 2006; Tripathi *et al.*, 2015).

#### **2.2.5.4 Vitaminas**

Son requeridas por las plantas para su desarrollo normal, catalizan procesos metabólicos, algunas pueden ser más necesarias que otras y pueden actuar como factores que limitan la diferenciación y desarrollo de las células en la técnica de

cultivo de *in vitro* (Torres, 2012). El medio MS emplea vitaminas del grupo B como la Tiamina (B1), Niacina (B3), Piridoxina (B6) y Mio-inositol. En casos específicos también se utiliza ácido pantoténico y vitaminas C, D Y E (Chimdessa, 2020). En algunas especies vegetales como la soja y el tabaco la falta de Tiamina en el medio de cultivo provoca la completa y rápida detención del crecimiento celular, sin embargo, especies como el cacahuate los niveles de Tiamina en las células se mantenían sin perturbaciones (Ohira y Ojima, 1976).

#### **2.2.5.5 Agente gelificante**

El cultivo de tejido en medio líquido y estático es inviable, la principal razón de esto se debe a que el tejido muere por la falta de oxígeno, por lo que es necesario solidificar el medio usando agentes gelificantes, por lo tanto, este debe ser inerte, soportar la esterilización y ser líquidos en caliente para su uso más práctico. Los más comunes son agar, agarosa y goma gellan (Chimdessa, 2020).

#### **2.2.5.6 Fitoreguladores en el cultivo *in vitro***

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitoreguladores son usados ampliamente en la agricultura y la biotecnología vegetal debido su funcionalidad en la generación de cambios fisiológicos que van desde la germinación de las semillas hasta el desarrollo del organismo o incluso la inhibición del mismo (Ventura y Huamán, 2020).

Estas sustancias se sintetizan en laboratorios o bien son obtenidos de la naturaleza; difieren de las hormonas vegetales o fitohormonas, debido a que estas últimas las produce la planta internamente, cabe recalcar que los fitoreguladores son mucho más potentes que su homólogo en la naturaleza (Alcántara-Cortes *et al.*, 2019).

Es por esa razón que se usan mínimas dosis para generar cambios observables a simple vista (Santner *et al.*, 2009). En los últimos años se han fabricado o descubierto compuestos químicos que controlan funciones específicas, por lo que se decide agruparlos en cuanto a las funciones que cumplen dentro de los organismos vegetales (Rinaldi *et al.*, 2012).

Hoy en día se conocen diez agrupaciones, las cuales son las auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliamidas, brasinoesteroides, jasmonatos, etileno y estrigolactonas (Alcántara *et al.*, 2019).

El grupo de las auxinas está conformado por ácidos como el indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D). Las auxinas regulan procesos biológicos internos como la división y diferenciación celular; así como su expansión y elongación, al activar bombas de protones que acidifican la pared celular (Brummer *et al.*, 1984). Inhiben el crecimiento de yemas laterales favoreciendo el crecimiento del meristemo apical esto se traduce en un crecimiento vertical dominante, también están involucradas en las respuestas ante la luz (fototropismo) y gravedad (gravitropismo), la formación de raíces, la floración y formación de frutos (Berleth *et al.*, 2007). Es normal que las auxinas se encuentren en toda la planta, pero su síntesis es mayor en regiones que están activamente en desarrollo como son raíces, meristemos apicales, frutos y hojas jóvenes (Band, 2021). La auxina predominante en las plantas es el (AIA) su movimiento es direccional dentro de la célula (Ludwig-Müller, 2014).

La bencilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ), zeatina y la kinetina, pertenece a otro grupo denominado citoquininas; son esenciales porque estas regulan procesos fisiológicos como el crecimiento y desarrollo de los organismos vegetales, su síntesis comienza desde la zona basal hasta los brotes nuevos, se mueve a través del sistema vascular, específicamente por el xilema (Glanz-Ildan *et al.*, 2020; Carnelos *et al.*, 2022). La presencia en la planta de esta fitohormona está relacionada con cambios en muchos factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas como son, la división celular, la generación y desarrollo de brotes, desarrollo vascular y embrionario, mayor capacidad fotosintética, dominancia apical, aumento en la asimilación de carbono, así como el retraso de la senescencia y como respuesta a estrés (Kieber y Schaller, 2014; Hönig *et al.*, 2018; Glanz-Ildan *et al.*, 2020).

En el cultivo *in vitro* se ha demostrado que su aplicación a bajas concentraciones induce a un mayor número de brotes por explante (Valle, 2021). A altas

concentraciones se genera una Rediferenciación inversa o Desespecialización celular, provocando la generación de callos, esto se traduce en una menor tasa de multiplicación (Chamorro *et al.*, 2007).

Otro grupo de importancia son las Giberelinas generalmente se encuentra como ácido giberelico AG<sub>3</sub>, AG<sub>2</sub>, AG<sub>1</sub> (Salazar-Cerezo *et al.*, 2018). Estas interactúan con las auxinas y citoquininas para desencadenar cambios fisiológicos relacionados con la germinación o ruptura de latencia de la semilla y cambios transicionales como es el de meristemo a desarrollo de brotes, o de la fase vegetativa a floración, las giberelinas también tienen un rol importante en la expresión sexual (Gupta y Chakrabarty, 2013). Su uso en el cultivo *in vitro* radica precisamente en la capacidad que tiene esta fitohormona para iniciar morfogénesis, como es la germinación o rompimiento de la latencia o dormancia de la semilla y la generación de brotes, en otras palabras, es una fitohormona necesaria, que combinada con otras es imprescindible para la regeneración de nuevas plantas a partir de tejido (Saldívar-Iglesias *et al.*, 2010).

El ácido abscísico (ABA) es la hormona responsable del bloqueo interno de la germinación, en otras palabras, la dormancia de la semilla (Beltrán-Peña *et al.*, 2016). Durante la maduración tardía o embriogénesis tardía, cuando la presencia del ácido absicico es elevada se produce la síntesis de proteínas que se encargan de proteger el embrión del proceso de deshidratación, denominadas proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA's), estas proteínas son expresadas por alrededor de ocho familias de genes presentes en su mayoría en especies con semillas tolerantes a la desecación (Tunnacliffe y Wise, 2007, Artur *et al.*, 2019). Se acumulan en grandes cantidades y son altamente solubles en agua debido a la naturaleza hidrofílica de los aminoácidos que componen dicha proteína, otra de las cualidades a resaltar es su resistencia a la desnaturalización por acción de altas temperaturas (Shih *et al.*, 2008).

### **2.2.6 Factores que afectan el cultivo *in vitro***

Como se ha descrito anteriormente el cultivo *in vitro* es una técnica que permite la propagación de plantas bajo condiciones controladas. Sin embargo, existen diferentes factores físicos, químicos y biológicos que están interrelacionados e influyen en el éxito (George *et al.*, 2008).

#### **2.2.6.1 Factores físicos (luz, temperatura, humedad relativa)**

La intensidad lumínica, fotoperiodo y calidad espectral influyen en la morfogénesis y el crecimiento. Por ejemplo, la luz azul (450–500 nm) promueve la formación de brotes, mientras que la roja (600–700 nm) favorece el enraizamiento. Generalmente se usan 16 horas de luz con intensidades de 30–50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Folta y Carvalho, 2015; Vela-Gutiérrez *et al.*, 2019). El rango óptimo de temperatura oscila entre 22–26°C para la mayoría de las especies. Temperaturas fuera de este rango pueden inhibir la división celular o inducir estrés oxidativo (Doctrinal *et al.*, 1989; Orozco *et al.*, 2000). Una humedad relativa alta (>70%) previene la deshidratación de los explantes, pero puede aumentar el riesgo de contaminación por hongos (George *et al.*, 2008).

#### **2.2.6.2 Factores químicos (composición del medio de cultivo, pH, gelificante).**

La concentración de nutrientes y la relación entre los diferentes reguladores de crecimiento (auxinas/citoquininas) deben ajustarse según la especie (Murashige & Skoog, 1962). Un pH óptimo oscila entre 5.2–5.8 favorece la absorción de nutrientes (Skirvin *et al.*, 1986). La sacarosa es comúnmente usada como fuente de energía para los explantes (Park *et al.*, 2023). El agar influye significativamente en la micropropagación al afectar el balance hídrico del medio y las hojas, probablemente debido al equilibrio entre la disponibilidad de agua y la acción de los reguladores del crecimiento. A bajas concentraciones la proliferación de brotes es afectada por la hiperhidricidad de los tejidos, sin embargo, a concentraciones altas el medio se vuelve más sólido, esto se traduce en una mayor retención de agua afectando así su disponibilidad para los explantes, por el contrario, una concentración moderada de agar (7,5 g/L) permite obtener brotes utilizables (Ghashghaie *et al.*, 1991).

### **2.2.6.1 Factores biológicos**

La edad fisiológica, tamaño y posición en la planta madre así también el genotipo, ortodoxo o recalcitrante son determinantes del éxito en el cultivo (Thorpe, 2007; Bhojwani y Dantu, 2013). Contaminación microbiana por hongos y bacterias pueden afectar el crecimiento del explante y comprometer el cultivo (Reed *et al.*, 2013).

## **2.3 Bases biológicas de la germinación y multiplicación**

### **2.3.1 La germinación de las semillas**

Después de la morfogénesis la semilla pasa por un proceso de maduración en el cual se genera una reorganización del metabolismo y la síntesis de azúcares, proteínas y lípidos; se le conoce a este proceso como “periodo de acumulación de reservas” (Angelovici *et al.*, 2010). Durante este proceso se reduce el contenido de agua en la semilla, principalmente porque es sustituida por los compuestos de reserva, posteriormente se va adquiriendo gradualmente tolerancia a la desecación (Blasiak *et al.*, 2006; Buitink y Leprince, 2008; Verdier *et al.*, 2013).

La germinación de la semilla es un proceso biológico que consta de múltiples sucesos (síntesis de moléculas, elongación celular, cambios estructurales subcelulares, hidratación de proteínas y respiración), que da como resultado un organismo nuevo (Bewley *et al.*, 1994). La germinación también es un proceso biológico complejo ya que la semilla tiene que recuperarse rápidamente de la deshidratación y reanudar su metabolismo de manera constante, para completar cambios celulares necesarios para la emersión del embrión (Nonogaki *et al.*, 2010).

Comienza por la absorción de agua por parte de la semilla, a este proceso se le denomina “Imbibición” y termina cuando se produce la elongación del eje embrionario, que por lo general es la radícula (Bewley *et al.*, 1994; Peña *et al.*, 2016). La Imbibición activa procesos metabólicos que conducen a la expansión del embrión, posterior a eso se activa rápidamente la respiración para suministrar energía requerida para el metabolismo (Bewley *et al.*, 2013).

### **2.3.2 Diferencias entre germinación *in vivo* e *in vitro*.**

Ambos métodos de germinación difieren principalmente en las condiciones ambientales; la germinación *in vivo* ocurre de forma natural donde los factores

ambientales (humedad, luz, temperatura, etc.) son fluctuantes influyendo en la tasa de éxito en la germinación, por otra parte, el cultivo *in vitro* ofrece condiciones ambientales controladas y la utilización de medios de cultivo con los nutrientes necesarios optimiza este proceso (Núñez y del Moral, 2016).

### **2.3.3 Factores que afectan la germinación de las semillas**

#### **2.3.3.1 Factores internos**

Entre los factores internos que afectan la germinación, está la longevidad de la semilla, la viabilidad del embrión, la calidad y cantidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia (Russo y Sams, 2010; Sano *et al.*, 2016). La longevidad de la semilla es el periodo de tiempo en el que la semilla posee viabilidad y la pérdida de dicha viabilidad está mediada por la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Sano *et al.*, 2016). La longevidad de las semillas es variada y depende si la semilla es ortodoxa o recalcitrante (Berjak y Pammenter, 2010). Desde los años setentas ya se tenía conocimientos sobre las características de las semillas con forma a su comportamiento, ortodoxas “tolerantes a la desecación” o recalcitrantes “no tolerantes” (Roberts, 1973).

#### **2.3.3.2 Factores externos**

Durante el almacenamiento de las semillas esta puede estar expuesta a estrés por factores ambientales como la luz, la temperatura, el agua y la asociación con diversos microorganismos, que desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (superóxido, peróxido de Hidrógeno, radicales Hidroxilo) que producen daño celular por lo tanto, las semillas poseen mecanismos para evitar el daño oxidativo, principalmente se basan en la protección y reparación del ADN, cabe recalcar que estos mecanismos están presentes únicamente en semillas consideradas ortodoxas (Sano *et al.*, 2016; Leprince *et al.*, 2017; Gómez, 2020; Matilla, 2021).

Como mecanismo de protección esta la vitrificación del citoplasma, dicha vitrificación es una matriz compuesta de diferentes azúcares de reserva (trehalosa, sacarosa y rafinosa). Este estado vítreo reduce el metabolismo y la motilidad de las moléculas, lo que se traduce en una limitada movilidad de agua y oxígeno reduciendo así el estrés oxidativo, que es dañino para las macromoléculas,

membranas y proteínas celulares (Buitink y Leprince, 2004; Sano *et al.*, 2016; Matilla, 2021).

Al estado de vitrificación se le suma la actividad antioxidante como mecanismo de defensa y en conjunto con las (Leprince *et al.*, 2017). Los mecanismos antioxidantes se dividen en dos categorías, enzimáticos y no enzimáticas dentro de las enzimáticas esta la producción de catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa; los mecanismos no enzimáticos involucran sustancias de bajo peso molecular como carotenoides, glutatión y ascorbato (Gill y Tuteja, 2010; Serkedjieva, 2011).

## **2.4 Micropropagación *in vitro* de cactáceas**

### **2.4.1 Características específicas de las cactáceas**

La familia cactácea reúne una amplia diversidad de plantas con formas y adaptaciones únicas que van desde los cactus columnares, como el “viejito” (*Cephalocereus senilis*) y el “cardón gigante” (*Pachycereus pringlei*), hasta los cactus de forma candelabroforme como son el “pitayo de octubre” o “órgano” (*Stenocereus thurberi*) y popular “saguaro” (*Carnegiea gigantea*). También incluye las biznagas y biznaguitas (genero *Mammillaria*), además de especies trepadoras como *Heliocereus spp.* y una extensa variedad de nopales (*Opuntia spp.*), los cuales son valorados por su importancia ecológica como económica (Goldstein y nobel, 1994; Anderson, 2001).

Originaria del continente americano, esta familia de tiene una historia evolutiva de cerca de 80 millones de años, lo que coincide con la expansión de las regiones áridas en américa, favoreciendo la diversificación y adaptación de las cactáceas a condiciones extremas de sequía y alta radiación solar (Guerrero *et al.*, 2019).

### **2.4.2 Tallo suculento**

Las cactáceas han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas específicas que les permiten prosperar en ambientes áridos, como la succulencia en los tejidos, que facilita la acumulación de agua, esta característica está bien documentada como una estrategia clave de supervivencia en condiciones de escasez hídrica, ya que los tallos suculentos pueden almacenar grandes cantidades de agua



permitiéndoles resistir periodos prolongado de sequía (Goldstein y Nobel, 1994; Bobich y North, 2009).

### **2.4.3 Espinas**

Otra adaptación crucial es la reducción o ausencia de hojas, lo que minimiza la pérdida de agua través de la evapotranspiración. En lugar de realizar la fotosíntesis en hojas, las cactáceas emplean sus tallos, donde el proceso fotosintético ocurre mediante el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), una vía metabólica que permite una eficiente absorción de CO<sub>2</sub> durante la noche, reduciendo la pérdida de agua en comparación con la fotosíntesis en el día (Gilman y Edwards, 2020; Sage *et al.*, 2023). Estas características han sido confirmadas en diversos estudios sobre la morfología y fisiología de las cactáceas, los cuales destacan la relación entre estas adaptaciones y el éxito ecológico de las especies en zonas áridas (Mauseth, 2006).

### **2.4.4 Obtención de material vegetal y preparación de explantes**

Para tener éxito en la micropropagación depende principalmente de la calidad del material vegetal (Álvarez, 2012). Es fundamental elegir una planta libre de patógenos para evitar contaminaciones en el cultivo. Comprometen el éxito del proceso (Pasternak y Steinmacher, 2024).

La selección de una planta madre con vigor genético es importante para maximizar la tasa de éxito de propagación y asegurara la estabilidad genética de las plantas resultantes. Este vigor también contribuye a una mayor resistencia al estrés en los procesos de propagación (Pasternak y Steinmacher, 2024).

El tipo de tejido seleccionado para el cultivo también es relevante, algunas plantas pueden regenerarse efectivamente a partir de segmentos de tallos o brotes, mientras que otras responden mejor al uso de otros órganos como raíces. La capacidad de, tejido para desdiferenciarse y reanudar la división celular también determina su idoneidad como explante, por ejemplo, los explantes juveniles, como los segmentos de tallos jóvenes, son más propensos a inducir la regeneración debido a su capacidad totipotencial en comparación a tejidos adultos (Lardon y Geelen, 2020; Long *et al.*, 2022).

Para el caso de las cactáceas se prioriza el uso de las semillas sobre el uso de tejido debido a varias razones técnicas y biológicas. Las semillas de cactáceas tienen un gran potencial en términos de variabilidad genética y fácil manipulación. Además, el uso de semillas suele ser más fácil de esterilizar y son menos propensas a sufrir contaminaciones durante el proceso inicial (Gomes *et al.*, 2006; Bouzroud *et al.*, 2022).

Desde el punto de vista biológico, las semillas permiten una regeneración más rápida y eficiente en algunas especies de cactus, así como lo demostraron los trabajos de investigación de Papafotiou *et al.* (2001) y Lema-Ruminska (2014), estos autores mencionan que al obtener *vitroplántulas* directas de semilla esta desarrolla estructuras más homogéneas, lo que facilita el establecimiento de cultivos vigorosos.

El uso de tejidos como explantes, aunque es útil, puede enfrentar desafíos adicionales como la formación de callos no deseados o la vitrificación de las plantas, que afecta negativamente, la calidad del material vegetal generado. Por esto último es que el uso de semillas es preferible en la micropropagación de cactáceas, ya que conlleva menos complicaciones durante las primeras fases del cultivo y el potencial para obtener plantas genéticamente diversas (Lema-Ruminska y Kulus, 2014, Bouzroud *et al.*, 2022).

#### **2.4.5 Métodos de esterilización**

Para la esterilización de tejido vegetal y semillas, se utilizan diversos métodos con el fin de minimizar la contaminación microbiana y proteger la viabilidad de los explantes en condiciones *in vitro*. Estos métodos incluyen pretratamientos como enjuagues con detergente seguido de enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, es común el uso de alcohol etílico al 70% durante periodos cortos de 1 a 3 minutos, seguidos de enjuagues con agua destilada estéril y se completa el proceso con hipoclorito de sodio al 50% para asegurar la desinfección, al final se eliminan los residuos de NaOCl con agua destilada estéril (Murashige & Skoog, 1962).

#### **2.4.6 Inducción y mantenimiento de brotes**

Los brotes se inducen mediante la adición de citocininas en el medio de cultivo, generalmente en combinación con auxinas y su relación determina si se forman brotes múltiples o raíces (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2012; Kurepa y Smalle, 2022). Por ejemplo, se pueden obtener múltiples brotes, hasta 15 aproximadamente con una concentración en relación 10:1 de KIN y AIB para la micropropagación de *Epithelantha micromeris*, cactácea en estatus de riesgo (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2012). La frecuencia de subcultivo cada 4-6 semanas es un protocolo estándar en cultivo *in vitro* para mantener la viabilidad de los tejidos, las razones principales por las que se realiza el subcultivo son debido al agotamiento de los nutrientes, la acumulación de metabolitos tóxicos y la deshidratación del medio (George *et al.*, 2008).

### **2.5 Beneficios de la propagación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus***

#### **2.5.1 Conservación y aprovechamiento sostenible**

La propagación *in vitro* ofrece herramientas clave para la conservación de cactus endémicos de México y en peligro de extinción; Permite multiplicar ejemplares a partir de tejidos de plantas silvestres sin afectar sus poblaciones naturales. Proporciona material genético para reintroducciones en hábitats degradados, asegurando diversidad genética; Facilita el almacenamiento a largo plazo en bancos de germoplasma bajo condiciones controladas y reduce la presión por colecta ilegal; La propagación *in vitro* permite un aprovechamiento sostenible al producir masivamente plantas para comercio legal (evitando la extracción ilegal), generar ingresos mediante viveros comunitarios y conservar la especie mediante reintroducciones. Esta técnica satisface la demanda ornamental y farmacéutica, reduce costos de producción y puede integrarse con ecoturismo y educación ambiental, equilibrando uso económico y protección de poblaciones silvestres (Giusti *et al.*, 2002; Lema- Rumińska y Kulus 2014; Palacios *et al.*, 2016; Boeri, 2017; Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2022, Mora-Cruz *et al.*, 2023).

### **2.5.2 Investigación y desarrollo tecnológico**

La propagación *in vitro* ha generado importantes avances tecnológicos, incluyendo protocolos optimizados con reguladores de crecimiento (BAP+ANA), control de hiperhidricidad mediante paclobutrazol, y desarrollo de técnicas como biorreactores y criopreservación. Se ha podido estudiar sus respuestas al estrés oxidativo, y explorar aplicaciones farmacéuticas mediante cultivos celulares. Los hallazgos, aunque prometedores, requieren aún mayor estandarización para su escalamiento comercial y aplicación en otras especies de cactaceas (García-Osuna *et al.*, 2011).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación geográfica del sitio experimental

La investigación se realizó en verano del 2024, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) del Campo Experimental Saltillo del Instituto de Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CIRNE-INIFAP), ubicado en Carretera Saltillo-Zacatecas, Km. 342+119, N° 9515 Col. Hacienda Buenavista 25315, Saltillo, Coahuila. Coordenadas 25°20'37.9" N 101°01'59.9" W y altitud de 1,520 msnm. Clima BSoh (x'), cálido y semiárido (clasificación de Köppen modificado por García, 2004). Temperatura media anual de 16.4 °C y precipitación de 610 mm.

#### 3.2 Material vegetativo

Se utilizó semilla de la accesión CESAL-Turval-2 de la biznaga cono invertido de Valdez (*Turbinicarpus valdezianus*) obtenidas del Banco de Germoplasma de Cactáceas del CESAL (CIRNE-INIFAP).

#### 3.3 Desinfección de semillas

En este estudio se utilizó semilla pura obtenida de un análisis de pureza previo, realizado con un soplador South Dakota® modelo CFY-II, con una abertura de 3 cm por 1 min<sup>-1</sup>, como lo establece el International Seed Testing Association (ISTA, 2021), misma que se realizó en el Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas (CCDTS) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, se realizó la desinfección de las semillas para eliminar o inactivar microorganismos (bacterias y hongos) que se encuentran en la superficie de la semilla.

Este proceso se hizo en la Campana de Flujo Laminar (VECO, Modelo JCGHFLA12/24) mediante el siguiente procedimiento

### **3.3.1 Limpieza inicial de la semilla**

Las semillas se lavaron con agua destilada estéril para eliminar cualquier otro residuo. Posteriormente, se procedió con una desinfección con sulfato de cobre, seguido de un enjuague exhaustivo con agua destilada.

Tratamiento con alcohol: Las semillas se lavaron en una solución de etanol (alcohol etílico) al 70% durante 3 minutos. Este paso ayuda a eliminar las capas de cera y lípidos de la superficie de la semilla, facilitando la acción del desinfectante principal.

### **3.3.2 Desinfección química**

Se hizo con hipoclorito de sodio (cloro) al 30% durante 3 minutos. Durante este paso, es importante agitar suavemente las semillas de forma intermitente para asegurar que el desinfectante cubra toda la superficie.

### **3.3.3 Enjuague estéril**

Una vez finalizado el tiempo de desinfección, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. Este es un paso crucial para eliminar por completo los residuos del desinfectante, ya que cualquier traza podría ser fitotóxica y dañar el embrión de la semilla, impidiendo su germinación. Durante cada paso de desinfección se utilizó un equipo de agitación (SEA STAR, HSA 00315) a 250 rpm durante el tiempo establecido

### **3.3.4 Siembra**

Una vez enjuagadas, las semillas se siembran en tubos de ensayo con un volumen de 10 mL de medio de cultivo estéril dentro de la Campana de flujo laminar (**Figura 6**).



**Figura 6. Establecimiento de semillas de *T. valdezianus* en tubos de ensayo, con 10 mL de medio.**

### 3.4 Ensayo de germinación *in vitro*

#### 3.4.1 Diseño experimental

La prueba de germinación estándar se hizo con base a las reglas del International Seed Testing Association (ISTA, 2021), con modificación en el número de semillas por unidad experimental, debido a la reducida cantidad de semilla pura obtenida. Mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2 de efectos fijos se establecieron cuatro tratamientos, Bajo la hipótesis  $H_0: T_1=0 \ T_2=0 \ T_3=0 \ T_4=0$  vs  $H_1$ : el tipo de medio de cultivo y la adición de fitorregulador influye en las variables respuesta (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1. Composición de los tratamientos utilizados en la germinación *in vitro* de *T. valdezianus*.**

ID	Factores	Descripción
T1	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	0.6% agar + 87.64 mM C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
T2	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>	0.6% agar + 87.64 mM C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> + 8.65 µM de (AG <sub>3</sub> )
T3	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	MS (Murashige-Skoog, 1962) al 50 %)
T4	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	MS 50% + 8.65 µM de AG <sub>3</sub>

Descripción de los tratamientos evaluados; **A<sub>0</sub>** = Medio base con 0.6 % de agar y 87.64 mM de sacarosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>); **A<sub>1</sub>** = Medio Murashige y Skoog (MS, 1962) al 50 % de su concentración iónica; **B<sub>0</sub>** = Sin adición de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>); **B<sub>1</sub>** = Con adición de 8.65 µM de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

En este ensayo se establecieron 40 semillas como unidad experimental con 3 repeticiones, para evaluar 120 unidades experimentales por tratamiento. En total se evaluaron en este ensayo 480 semillas. Este tamaño de muestra es válido de acuerdo con Rao *et al.* (2007) y Di Sacco *et al.* (2020) quienes sugieren que, para especies con problemas de regeneración, como es el caso de taxones silvestres como *Turbinicarpus valdezianus*, un buen tamaño de muestra oscila entre 100 y 300 semillas para un análisis con validez estadística.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el entorno de programación R (versión 4.3.2; R Core Team, 2025). Para la visualización de datos y gráficos se empleó la librería 'tidyverse' (Wickham *et al.*, 2019). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con las siguientes librerías: 'agricolae' (Mendiburu, 2021), 'ARTool', 'emmeans', 'dplyr', 'car', 'MASS' (Venables & Ripley, 2002).

### 3.4.2 Modelo estadístico general

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Donde:**

***Y<sub>ijk</sub>***: valor observado de la variable dependiente para el i-ésimo nivel de A, j-ésimo nivel de B, k-ésima repetición.

***μ***: Media general.

***α<sub>i</sub>***: Efecto del i-ésimo nivel del factor A (medio de cultivo).

***β<sub>j</sub>***: Efecto del j-ésimo nivel del factor B (AG<sub>3</sub>).

***(αβ)<sub>ij</sub>***: Efecto de la interacción entre los factores A y B.



$\varepsilon_{ijk}$ : Error experimental, que se asume distribuido  $\sim N(0, \sigma^2)$

### 3.4.3 Variables dependientes

Cada siete días se analizó la cinética de la germinación, que se refiere al estudio del ritmo y patrón temporal con el que germinan las semillas de una población bajo condiciones ambientales o tratamientos específicos. En lugar de solo indicar cuántas semillas germinaron, la cinética analiza el momento en que lo hicieron, lo que ofrece una visión más completa del proceso de germinación (Ranal y Santana, 2006). Basado en las normas de la ISTA (2021), la germinación se considera completa cuando la radícula y la plúmula han emergido por completo. A los 35 días después de la siembra (dds), se evaluaron las siguientes variables: Altura de la vitroplanta (Al, mm); Longitud de la radícula (Lr, mm).

### 3.4.4 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la cinética de germinación, se emplearon modelos de supervivencia. Los datos consistieron en observaciones repetidas de germinación a lo largo del tiempo en unidades experimentales definidas por tubos individuales, con tratamientos combinados del tipo A (medio de cultivo) y B (presencia o ausencia de ácido giberélico, AG<sub>3</sub>).

Para el análisis de la cinética de germinación se usó un modelo no paramétrico de riesgos proporcionales de Cox donde se analiza la velocidad de germinación entre tratamientos y las diferencias significativas en el tiempo hasta la germinación (Cox, 1972). Mediante los siguientes parámetros: coef, coeficiente estimado del modelo; HR exp(coef), hazard ratio o riesgo relativo de germinación respecto a la categoría de referencia; se(coef), error estándar del coeficiente; z, estadístico de prueba asociado; *p*-valor, significancia estadística del efecto del tratamiento; e IC límite inferior del intervalo de confianza del 95 % del hazard ratio; IC 95% límite superior, proporcionando un rango plausible del efecto estimado. La significancia global del

modelo se evaluó mediante las tres pruebas estándar: likelihood ratio, Wald y score (log-rank), considerando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

Se verificaron los supuestos del modelo a una confiabilidad del 95%, mediante la prueba de riesgos proporcionales de Schoenfeld (Schoenfeld, 1982). Además, se realizaron comparaciones post hoc ( $\alpha = 0.05$ ) entre combinaciones de tratamientos (A:B) usando estimadores marginales ajustados (EMMeans) y letras significativas generadas con el paquete “multcompView” para facilitar la interpretación.

Se complementó con métricas descriptivas referentes al tiempo medio de germinación (TMG), expresado en días, la mediana de germinación (T50), porcentaje de germinación final (G, %) y el área bajo la curva de supervivencia (AUC), brindando una caracterización completa del proceso de germinación (Agacka-Mołodoch *et al.*, 2021).

Con los datos de las variables morfológicas; Altura de vitroplanta (Al, mm) y Longitud de radícula (Lr, mm) se verificaron los supuestos del modelo a una confiabilidad del 95%; se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965); homogeneidad de varianzas de Levene (Levene, 1960) y verificó la aditividad del modelo (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Después de verificar la normalidad ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas ( $p > 0.05$ ) se realizó un ANOVA, para estimar los efectos de los factores A (medio de cultivo), B (concentración ácido giberélico), así como sus interacciones de primer orden (AxB); cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad se aplicó la transformación Box Cox y/o la transformación logarítmica. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (Tukey, 1949) para detectar diferencias significativas.

Para la interpretación de los resultados de germinación se realizaron diferentes gráficos; comparaciones post-hoc del modelo de Cox, gráfica de residuos de Schoenfeld, curvas entre tratamientos con log-rank test, residuos vs. valores

ajustados para cada variable. Para las variables morfológicas se realizaron gráficos de los residuos vs. valores ajustados para cada variable, de la comparación de medias de Tukey de los factores y sus interacciones. El análisis se hizo con el entorno estadístico R (versión 4.3.2; R Core Team, 2025) utilizando las librerías: 'tidyverse', 'agricolae', 'ARTool', 'emmeans', 'dplyr', 'MASS' y 'car'.

### 3.5 Ensayo de multiplicación (Inducción de brotes)

En esta etapa se usaron segmentos basales como explantes que se subcultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de sus macrosales, suplementado con  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de mio-inositol,  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de tiamina-HCl, 3% de sacarosa y 0.65% de agar; adicionado con las diferentes concentraciones y combinaciones de Citoquinas y Auxinas correspondientes a los diferentes tratamientos. El pH de medio de cultivo de los ensayos de germinación y multiplicación se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$  antes de la esterilización en autoclave (SU-MI modelo SM-360-A) a  $120^\circ\text{C}$  y 15 PSI durante 20 minutos. Condiciones de Incubación. Temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscurida.

#### 3.5.1 Diseño Experimental

En este ensayo se consideró un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial  $2 \times 2$ ; Factor A (Concentración 2 niveles): Baja ( $2.5 \text{ mg/L}$  de citoquinina +  $0.25 \text{ mg/L}$  de auxina) y Alta ( $5.0 \text{ mg/L}$  de citoquinina +  $0.50 \text{ mg/L}$  de auxina). Factor B (Tipo de regulador de crecimiento 2 niveles): BA + ANA (6-bencilaminopurina + ácido  $\alpha$ -naftalenacético) y KIN + AIB (kinetina + ácido indolbutírico). Esto generó cuatro tratamientos (**Cuadro 2**). En este ensayo se estableció como UE=5 explantes por frasco, cada frasco se consideró como una repetición estableciendo 12 repeticiones por tratamiento, evaluando 60 explantes por tratamiento. En total en este ensayo se evaluaron 240 unidades experimentales. En este ensayo se planteó la hipótesis nula  $H_0 = \mu T_1 = \mu T_2 = \mu T_3 = \mu T_4$  que postula que ninguno de los factores tiene efectos sobre la variable respuesta, vs  $H_1$  que indica que al menos una de las

medias de tratamiento difiere de las demás, donde existe un efecto significativo de alguno de los factores.

### 3.5.2 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Donde:**

**$Y_{ijk}$ :** Valor observado de la variable dependiente para el i-ésimo nivel de A, j-ésimo nivel de B, k-ésima repetición.

**$\mu$ :** Media general.

**$\alpha_i$ :** Efecto del i-ésimo nivel del factor A Tipo de Fitoregulador.

**$\beta_j$ :** Efecto del j-ésimo nivel del factor B (Concentración).

**$(\alpha\beta)_{ij}$ :** Efecto de la interacción entre los factores A y B.

**$\varepsilon_{ijk}$ :** Error aleatorio asociado al k-ésimo dato en el tratamiento  **$\alpha_i\beta_j$**  asumido  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

#### Cuadro 2. Composición de los tratamientos utilizados en la multiplicación de brotes.

ID	Factores	Descripción
T1	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	2.5 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BA) + 0.25 mg/L de Ácido $\alpha$ Naftalenacético (ANA)
T2	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	5.0 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BA) + 0.50 mg/L de Ácido $\alpha$ -Naftalenacético (ANA)
T3	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>	2.5 mg/L de Kinetina (KIN) + 0.25 mg/L de Ácido Indolbutírico (AIB)
T4	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	5.0 mg/L de Kinetina (KIN) + 0.50 mg/L de Ácido Indolbutírico (AIB)

Descripción de los tratamientos evaluados; **A<sub>0</sub>** = Concentración baja de fitoreguladores; **A<sub>1</sub>** = Concentración alta de fitoreguladores; **B<sub>0</sub>** = Combinación de citocinina 6-bencilaminopurina (BA) con auxina ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA); **B<sub>1</sub>** = Combinación de citocinina kinetina (KIN) con auxina ácido indolbutírico (AIB).

### **3.5.3 Variables dependientes**

Los explantes se incubaron por ocho semanas evaluando como variables de respuesta; número de brotes por explante (Nb) y altura de brote (Al, mm), para determinar la tasa de multiplicación por tratamiento.

### **3.5.4 Análisis estadístico**

Con los datos de las variables morfológicas; número de brotes por explante (Nb) y altura de brote (Al, mm), se verificaron los supuestos del modelo a una confiabilidad del 95%; se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965); homogeneidad de varianzas de Levene (Levene, 1960). Después de verificar la normalidad ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas ( $p > 0.05$ ) se realizó un ANOVA, para estimar el efecto del Factor A (Concentración 2 niveles), Factor B (Tipo de regulador de crecimiento 2 niveles), así como sus interacciones de primer orden (A×B); cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad se aplicó la transformación Box Cox. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (Tukey, 1949). Para detectar diferencias significativas.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el entorno de programación R (versión 4.3.2; R Core Team, 2025). Para la visualización de datos y gráficos se empleó la librería 'tidyverse' (Wickham *et al.*, 2019). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con las siguientes librerías: 'agricolae' (Mendiburu, 2021), 'ARTool', 'emmeans', 'dplyr', 'car', 'MASS' (Venables & Ripley, 2002).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cinética de la germinación *in vitro*

#### 4.1.1 Modelo de Cox

El modelo de regresión de Cox se realizó utilizando el tratamiento T1 como referencia, por lo que los coeficientes y los hazard ratios de los demás tratamientos reflejan su efecto relativo en comparación con dicho tratamiento. El T1 corresponde a un medio “básico” utilizado como control, ya que contiene únicamente agar al 0.6% y sacarosa 87.64 mM, sin fitoreguladores (AG<sub>3</sub>) ni medio MS. Al tratarse de un medio simple, sin modificaciones que puedan alterar la germinación, permite evaluar el efecto relativo de la adición de AG<sub>3</sub> y/o la utilización de medio MS (tratamientos T2, T3 y T4) sobre los tiempos de germinación, comparándolos con una media base no modificada. El análisis del modelo de regresión de Cox ( $p < 0.05$ ) indicó que los tratamientos T2 ( $p = 0.908$ ), T3 ( $p = 0.978$ ) y T4 ( $p = 0.411$ ) no mostraron diferencias significativas en los tiempos de germinación respecto al tratamiento de referencia (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3. Modelo de Cox para la germinación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus*.  $HR < 1$  indica menor probabilidad relativa de germinar respecto al tratamiento 1, y  $HR > 1$  indica mayor probabilidad. Ninguna diferencia fue significativa ( $p > 0.05$ ).**

Tratamiento	coef	HR exp(coef)	se(coef)	z	p-valor	IC 95% inferior	IC 95% superior
T2	-0.0336	0.9669	0.2921	-0.115	0.908	0.5455	1.714
T3	-0.0081	0.9919	0.2918	-0.028	0.978	0.5599	1.757
T4	0.2385	1.2694	0.2898	0.823	0.411	0.7192	2.24

**coef**: Coeficiente del modelo; **HR exp(coef)**: Riesgo relativo de germinación; **se(coef)**: Error estándar; **z**: estadístico de prueba; **p-valor**: significancia; **IC 95%** inferior y superior: rango del intervalo de confianza del 95% del riesgo relativo.

El análisis de los hazard ratios ( $HR = \exp(\text{coef})$ ) indican el riesgo de germinación relativo al tratamiento de referencia. Los tratamientos T2 ( $HR = 0.9669$ ) y T3 ( $HR = 0.9919$ ) mostraron una ligeramente menor probabilidad de germinar más rápido que el tratamiento de referencia ( $HR < 1$ ), mientras que T4 ( $HR = 1.2694$ ) presentó una mayor probabilidad de germinar más rápido ( $HR > 1$ ), efecto atribuible a los componentes del medio de cultivo.

El valor de HR del T4 se respalda con su coeficiente ( $\text{coef} > 0$ ), ya que T4 ( $\text{coef} = 0.2385$ ) aumenta el riesgo de germinación respecto al tratamiento de referencia, es decir, promueve una germinación más rápida. Por el contrario, los tratamientos T2 ( $\text{coef} = -0.0336$ ) y T3 ( $\text{coef} = -0.0081$ ) presentan coeficientes negativos, indicando una germinación más lenta en comparación con el tratamiento de referencia.

El índice de concordancia del modelo ( $C\text{-index} = 0.53$ ) indica que el modelo explica el 53 % de la variable evaluada (germinación) aunque con una muy baja capacidad predictiva; mientras que las pruebas globales de significancia Likelihood ratio test, Wald test y score (log-rank) test, ( $\alpha = 0.05$ ) ( $p = 0.8$ ) corroboran que los tratamientos no presentan efectos globales significativos sobre los tiempos de germinación, por lo que la hipótesis nula ( $H_0$ ) no se rechaza (**Cuadro 4**).

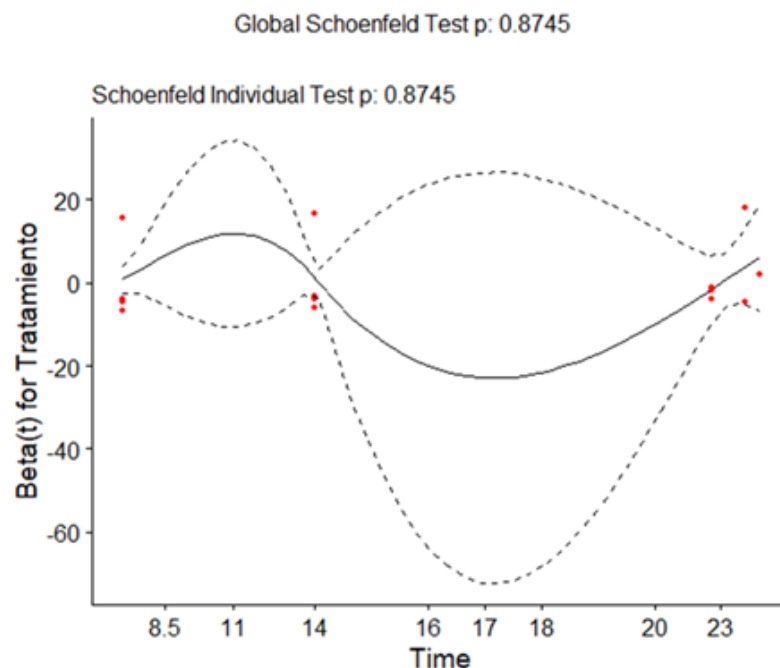
**Cuadro 4. Índice de concordancia (C-index) y las pruebas de significancia global (Likelihood ratio, Wald y log-rank).**

Prueba	Valor	gl	p
Índice de concordancia (C-index)	0.53	—	—
Likelihood ratio test	1.09	3	0.80
Wald test	1.14	3	0.80
Score (log-rank) test	1.14	3	0.80

gl = grados de libertad; p = nivel de significancia.

La prueba de riesgos proporcionales de Schoenfeld confirmó que se cumplió el supuesto de riesgos proporcionales del modelo ( $p = 0.87$ ), validando la adecuación del modelo de Cox. En los residuos de Schoenfeld para tratamiento, se observa que la función suavizada del coeficiente fluctúa en torno a cero sin un patrón sistemático evidente. Además, los intervalos de confianza contienen el valor cero en casi todo

el rango de tiempo, lo cual respalda visualmente la validez del supuesto (**Figura 7**). Aunque el análisis no evidenció efectos significativos de los tratamientos sobre la cinética de germinación, se considera estadísticamente válido. Si bien los resultados no permiten establecer inferencias concluyentes, proporcionan información relevante que contribuye a la comprensión del comportamiento germinativo de las semillas en el contexto de este estudio y dado que el C-index indica una capacidad predictiva limitada, se recurrió a métricas descriptivas como la mediana de germinación (T50), el Tiempo Medio de Germinación (TMG), el porcentaje de germinación final (G, %) y el Área Bajo la Curva de Supervivencia (AUC) así como una prueba post hoc para determinar la velocidad, uniformidad y capacidad germinativa de los tratamientos evaluados.



**Figura 7. Cinética de germinación. Residuos de la prueba Schoenfeld del modelo Cox ( $p > 0.05$ ) (indica que no hay evidencia de violación del supuesto de proporcionalidad).**



#### 4.1.2 Mediana germinación (T50)

La mediana del tiempo hasta la germinación (T50) fue de 14 días de un total de 35 días evaluados para todos los tratamientos, mientras que la germinación final superó el 95% en todos los casos, siendo del 100% en los tratamientos T1 y T4 (Cuadro 5).

#### 4.1.3 Tiempo medio de germinación (MTG)

En cuanto al tiempo medio de germinación (MTG), se observó una ligera reducción en los tratamientos T3 y T4 (12.5 y 12.2 días, respectivamente) en comparación con el tratamiento T1 (13.7 días) (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Métricas descriptivas de la germinación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus* por tratamiento.**

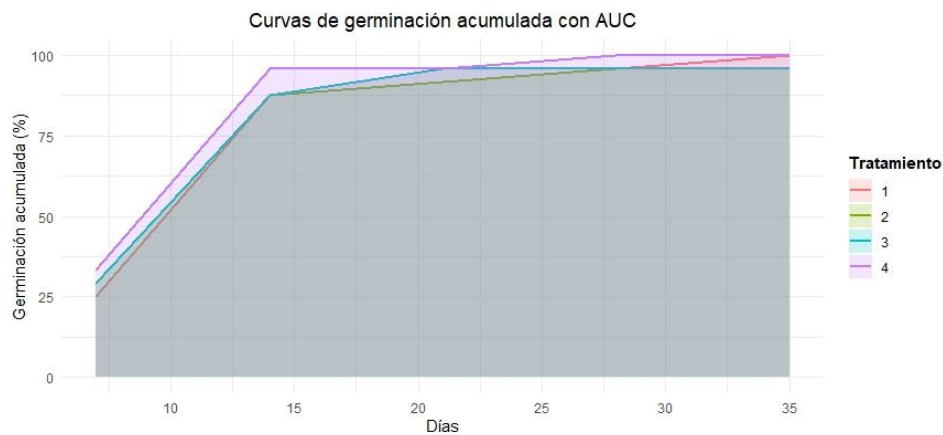
Tratamiento	T50	Germinación final	MTG	AUC
1	14	100%	13.7	2392
2	14	95.8%	12.8	2363
3	14	95.8%	12.5	2392
4	14	100%	12.2	2508

T50 = tiempo medio hasta el 50 % de germinación; MTG = tiempo medio de germinación (Mean Time to Germination); AUC = área bajo la curva de germinación.

#### 4.1.4 Área bajo la curva (AUC)

El área bajo la curva (AUC), que integra el porcentaje acumulado de germinación a lo largo del tiempo, es un indicador de la rapidez y uniformidad del proceso (Scott *et al.*, 1984). Valores más altos reflejan una germinación más temprana y consistente, mientras que valores bajos indican procesos más lentos o escalonados. En este estudio, las diferencias en AUC entre tratamientos fueron mínimas, las curvas de germinación acumulada mostraron un patrón similar entre tratamientos, alcanzando porcentajes cercanos al 100 % hacia el día 30 de evaluación. El tratamiento T4 presentó una pendiente inicial más pronunciada, logrando valores máximos alrededor del día 15, mientras que los tratamientos T1, T2 y T3 mostraron un incremento más gradual. Sin embargo, al final del periodo, todos los tratamientos alcanzaron porcentajes de germinación comparables. El análisis del área bajo la curva (AUC) indicó que T4 presentó valores ligeramente superiores, lo que refleja

una germinación más temprana, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas; sin embargo, biológicamente los resultados sugieren la importancia del medio T4 en la germinación de *Turbinicarpus valdezianus*, a pesar de que la cinética de germinación fue prácticamente equivalente, en concordancia con los resultados del modelo de Cox y las métricas TMG, AUG y T50 (**Figura 10**).



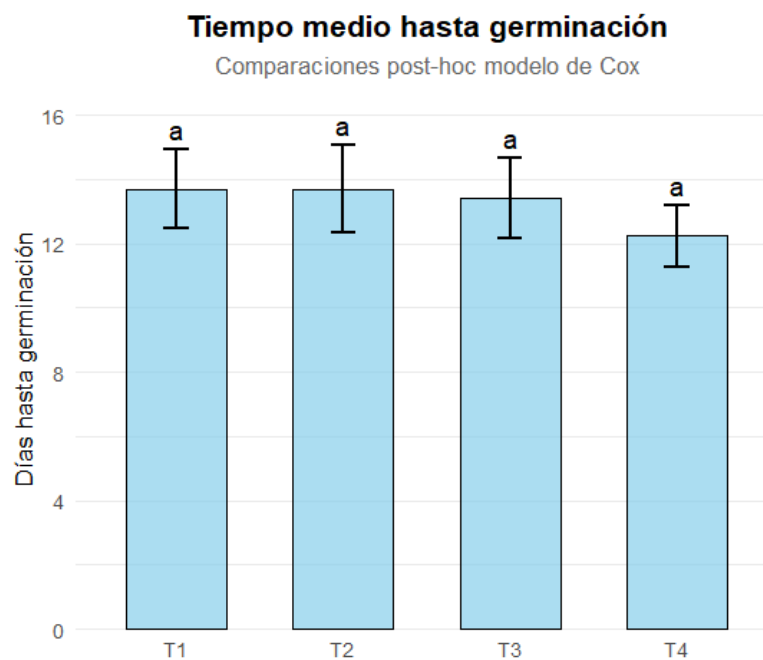
**Figura 8. Área bajo la curva del porcentaje acumulado de germinación (AUC) de *T. valdezianus*.**

#### 4.1.5 Prueba post-hoc

Los resultados de los análisis Post hoc para el modelo de Cox muestran que Tratamiento 4 tuvo el tiempo medio de germinación más bajo, con aproximadamente 12.2 días. Este resultado indica que las semillas en este tratamiento germinaron más rápido en promedio en comparación a las de los otros tratamientos. Los tratamientos T1 y T2 mostraron los tiempos medios más altos, alrededor de 14 días, mientras que el T3 se situó en un punto intermedio.

Las letras "a" sobre las barras de error indican que, a pesar de que T4 fue el más rápido, las diferencias en los tiempos medios de germinación no son estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos; sin embargo, el tratamiento T4 parece ser el más eficiente y para especies en estatus de riesgo como *T. valdezianus* este tratamiento puede considerarse como el más

recomendable en términos prácticos, debido a que en especies vulnerables como es este, caso la disponibilidad de semilla es extremadamente limitada y cada plántula obtenida representa un recurso genético valioso para los programas de conservación; en este contexto la elección de un tratamiento debe trascender la significancia estadística, priorizar la viabilidad de las plántulas y maximizar la eficiencia del uso del germoplasma (**Figura 9**).



**Figura 9. Comparación post-hoc del modelo de Cox ( $p > 0.05$ ) de los tratamientos evaluados en la germinación *in vitro* de *T. valdezianus*. (Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí).**

El análisis de supervivencia mediante el modelo de Cox no mostró diferencias significativas en la cinética de germinación entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia consistente donde el tratamiento T4 (medio MS + AG<sub>3</sub>) presentó los valores más bajos en tiempo medio de germinación (TMG) y el mayor hazard ratio (HR = 1.27), sugiriendo un efecto promotor en la velocidad de germinación (Waadt *et al.*, 2022).

El análisis de residuos de Schoenfeld respalda este resultado y sugiere que las semillas utilizadas poseían alta viabilidad y vigor, lo que podría haber enmascarado posibles efectos de los tratamientos. La alta germinabilidad (>95%) en todos los tratamientos, incluido el control T1 (medio básico), indica que las semillas de *T. valdegianus* se encuentran en estado de quiescencia más que en dormancia profunda o verdadera, respondiendo favorablemente a las condiciones ambientales óptimas. Sin embargo, se observa una tendencia aceleradora del T4 sugiriendo la presencia de una ligera dormancia fisiológica que puede ser superada por la acción sinérgica entre los nutrientes del medio MS y la actividad del AG<sub>3</sub> (Dresch *et al.*, 2014; Waadt *et al.*, 2022; Magnani y Cardoso, 2023).

Se tienen estudios del mecanismo de germinación y la ruptura de la latencia en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, dicho mecanismo está controlado por la interacción antagónica entre el ácido giberelinas (AG<sub>3</sub>) y ácido abscísico (ABA). Mientras ABA mantiene la latencia a través del complejo DELLA–ABI3/ABI5, promoviendo sus propios genes de biosíntesis e inhibiendo los de AG<sub>3</sub>, la acción de AG<sub>3</sub> inactiva a DELLA y disocia el complejo DELLA–ABI5, reduciendo la señal de dormancia; factores como ICE1 también contribuyen a debilitar esta represión, de modo que las AG<sub>3</sub> favorecen la transición hacia la germinación en condiciones óptimas (Waadt *et al.*, 2022).

Posteriormente AG<sub>3</sub> estimula la síntesis de enzimas hidrolíticas como α-amilasas y proteasas, cruciales para la degradación de almidón y proteínas de reserva, liberando azúcares y aminoácidos que nutren al embrión (Liao *et al.*, 2025). También junto a otras 2 fitohormonas (etileno y auxinas) modulan la expansión de las células del hipocótilo y radícula, lo que facilita la emergencia de la radícula a través de la testa y el endospermo (Saibo *et al.*, 2003; Martínez-Andújar *et al.*, 2012). Mientras que el medio MS provee los cofactores minerales necesarios para la actividad enzimática y el desarrollo embrionario (Murashige y Skoog, 1962; Bewley y Black 1994).

En semillas fotoblásticas positivas (que requieren luz para germinar, como muchas cactáceas), la luz roja (RED) y luz roja lejana (FR) activan fitocromos como PHYB y Pfr (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2013; Yang y Pritchard, 2022). Estos fitocromos inducen la síntesis o activación de giberelinas endógenas (Reid y Carr, 1968; Hisamatsu *et al.*, 2005). Con la aplicación de GA<sub>3</sub> exógena, se puede “saltar” el paso de activación por luz y desencadenar la germinación aun en ausencia de señal lumínica (Sawada *et al.*, 2008).

Los resultados de este trabajo concuerdan con el patrón reportado por Rojas-Aréchiga *et al.* (2013) para cactáceas adaptadas a ambientes áridos, donde la germinación rápida y sincrónica representa una ventaja adaptativa. La limitada respuesta a los tratamientos externos coincide con Flores y Jiménez-Bremont (2008), quienes demostraron que en *Turbinicarpus spp.* La calidad fisiológica de las semillas y su estado de maduración son determinantes primarios de la velocidad germinativa. Los valores de T50 obtenidos (12-14 días) se sitúan dentro del rango documentado para cactáceas globosas de crecimiento lento, siendo consistentes con los reportados por Manzo *et al.* (2022) para *Echinocactus grusonii* (13 días) y Ramírez-González *et al.* (2019) para especies del género *Mammillaria*.

Para programas de propagación a gran escala con limitaciones de recursos, el uso del medio básico (T1) resulta adecuado dada la alta viabilidad germinativa intrínseca. Sin embargo, en programas de conservación de germoplasma donde se priorice la maximización del éxito germinativo y la uniformidad, especialmente con lotes de semillas de baja calidad o procedentes de poblaciones reducidas, se recomienda el tratamiento T4 (MS + AG<sub>3</sub>). Este tratamiento no solo mostró una tendencia a acelerar la germinación, sino que también provee las condiciones nutricionales ideales para el desarrollo post-germinativo.

Se concluye que *T. valdezianus* posee semillas con alta capacidad germinativa basal y quiescencia superficial, cuya expresión completa requiere principalmente de condiciones ambientales adecuadas. La influencia de los tratamientos es marginal, pero biológicamente relevante, particularmente la combinación sinérgica entre el

medio MS y el AG<sub>3</sub> en el tratamiento T4, es la opción más eficiente para optimizar la germinación en programas de conservación que requieran maximizar el rendimiento por semilla.

#### 4.2 Análisis de varianza de las variables morfológicas de las vitroplantas

Altura (Al, mm). - El análisis de varianza factorial (ANOVA) 2x2 reveló efectos altamente significativos para el tipo de medio (Factor A,  $p < 3.22\text{e-}13$ ), la presencia de ácido giberélico AG<sub>3</sub> (Factor B,  $p < 7.74\text{e-}10$ ), así como para la interacción entre ambos factores (AxB),  $p < 2.74\text{e-}05$  (**Cuadro 6**).

Longitud de raíz (Lr, mm). - El ANOVA indicó diferencias significativas para el tipo de medio (Factor A,  $p < 5.11\text{e-}06$ ), mientras que la presencia de ácido giberélico (Factor B,  $p = 0.3462$ ) y la interacción (AxB,  $p = 0.0347$ ) no mostraron diferencias significativas (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6. Resultados del análisis de varianza factorial (ANOVA 2x2) para las variables altura (Al) y longitud de raíz (Lr).**

Variables		Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Al	A (medio)	529.0	529.0	71.32	3.22e-13 ***
	B (AG <sub>3</sub> )	346.0	346.0	46.64	7.74e-10***
	AxB	144.0	144.0	19.41	2.74e-05 ***
Lr	A (medio)	94.1	94.09	23.352	5.11e-06 ***
	B (AG <sub>3</sub> )	3.6	3.61	0.896	0.3462
	AxB	18.5	18.49	4.589	0.0347 *

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

##### 4.2.1 Pruebas de normalidad para altura vitroplanta y longitud de raíz

El análisis de residuos para la variable Altura de vitroplantula (Al) reveló violaciones a los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk,  $p = 4.85\text{e-}03$ ) y homogeneidad de varianzas (Levene,  $p < 5.701\text{e-}08$ ).

En contraste, para la variable Longitud de raíz (Lr), las pruebas de supuestos mostraron que los residuos siguieron una distribución normal (Shapiro-Wilk,  $p = 0.2236$ ), aunque no se cumplió la homogeneidad de varianzas (Levene,  $p < 1.75\text{e-}03$ ) (**Cuadro 7**).

**Cuadro 7. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para las variables morfológicas altura (Al) y longitud de raíz (Lr).**

<i>Variable</i>	<i>Shapiro-Wilk normality test</i>	<i>Levene's Test for Homogeneity of Variance</i>
<b>Al</b>	<b>W = 0.96113 p-value = 0.004845</b>	<b>F value = 14.743 Pr(&gt;F) = 5.701e-08 ***</b>
<b>Lr</b>	<b>W = 0.98294 p-value = 0.2236</b>	<b>F value = 5.415 Pr(&gt;F) = 0.001745 **</b>
<b>Signif. codes:</b> 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

Debido a violaciones de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, en ambas variables Al y Lr se aplicó una transformación Logarítmica con los datos transformados se observó una mejora en el cumplimiento de los supuestos, para Al normalidad (Shapiro-Wilk,  $p = 0.2999$ ) y homogeneidad de varianzas (Levene,  $p = 0.06198$ ). Para la variable Lr, normalidad (Shapiro-Wilk,  $p = 0.1709$ ) y homogeneidad de varianzas (Levene,  $p = 0.0856$ ) (**Cuadro 8**).

**Cuadro 8. Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad para las variables transformadas.**

<i>Variable</i>	<i>Shapiro-Wilk normality test</i>	<i>Levene's Test for Homogeneity of Variance</i>
<b>Al trans</b>	<b>W = 0.98466 p-value = 0.2999</b>	<b>F value = 2.5269 Pr (&gt;F) = 0.06198.</b>
<b>Lr trans</b>	<b>W = 0.98141 p-value = 0.1709</b>	<b>F value = 2.672 Pr (&gt;F) = 0.0856.</b>
<b>Signif. codes:</b> 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

Para la variable Al, el nuevo modelo con transformación Logarítmica mantuvo la significancia de los efectos principales de los factores A (tipo de medio,  $p < 2.52e-14$ ) y B (AG<sub>3</sub>,  $p < 3.86e-10$ ), así como de su interacción AxB ( $p = 7.84e-04$ ), lo que valida la estructura factorial del diseño experimental.

Por otro lado, el modelo con transformación Logarítmica para la variable Lr indicó diferencias significativas únicamente para el factor A ( $p < 1.12e-05$ ), mientras que ni el factor B ( $p = 0.4486$ ) ni la interacción AxB mostraron efectos significativos, aunque esta última presentó una tendencia cercana a la significancia ( $p = 0.0694$ ) (**Cuadro 9**).

**Cuadro 9. Resultados del ANOVA factorial 2x2 para las variables morfológicas transformadas.**

Variables		Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Al trans	A (medio)	4.030	4.030	80.33	2.52e-14 ***
	B (AG <sub>3</sub> )	2.443	2.443	47	3.86e-10 ***
	AxB	0.604	0.604	12.04	0.000783 ***
Lr trans	A (medio)	1.938	1.938	21.487	1.12e-05 ***
	B (AG <sub>3</sub> )	0.052	0.0522	0.579	0.4486
	AxB	0.304	0.3042	3.373	0.0694.

**Signif. codes:** 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Luego de verificar los supuestos del modelo transformado, se procedió a realizar comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey HSD ( $\alpha = 0.05$ ) para los efectos principales (A y B) y su interacción AxB.

#### 4.2.2 Efecto del tipo de medio (Factor A)

##### 4.2.2.1 Altura de brotes (Al)

El Factor A<sub>1</sub> (medio MS al 50%) promovió un mayor crecimiento en altura de las plántulas en comparación con el Factor A<sub>0</sub> (medio con agar al 0.6% y 87.64 mM de sacarosa). La diferencia fue estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), ya que A<sub>1</sub> alcanzó una media ajustada de 11.77 mm, mientras que A<sub>0</sub> registró 7.38 mm, ubicándose en grupos distintos ("a" y "b") de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples. (**Figura 10**).

Esta diferencia estadísticamente significativa confirma que la composición nutricional del medio de cultivo es un factor determinante en las etapas iniciales del desarrollo *in vitro* de *T. valdezianus* (Buyukdemirci, 2005).

Desde una perspectiva fisiológica, este resultado puede atribuirse a que el medio MS al 50% proporciona un balance óptimo de macro y micronutrientes esenciales que actúan como cofactores enzimáticos y precursores metabólicos para procesos clave de crecimiento como la división y elongación celular (Buyukdemirci, 2005). Específicamente, el balance de nitrógeno en formas de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y amonio



( $\text{NH}_4^+$ ) es crucial para la síntesis de aminoácidos, proteínas y clorofila, mientras que el potasio regula la presión de turgencia mediante la activación de bombas de  $\text{H}^+$ -ATPasa en la membrana plasmática, facilitando la expansión celular (Murashige y Skoog, 1962; George *et al.*, 2008).

Por el contrario, el medio  $A_0$ , aunque suficiente para la germinación, carece de estos nutrientes, limitando el crecimiento una vez agotadas las reservas endógenas de la semilla. Este hallazgo concuerda consistentemente con estudios previos en cactáceas donde medios nutritivos como MS favorecen el desarrollo de plántulas. En *Aztekium hintonii* y *Leuchtenbergia principis*, el medio MS al 50% mostró superioridad significativa sobre medios básicos en el desarrollo morfológico temprano (González y Valdés, 2015).

Similarmente, estudios en *Melocactus conoidus* han documentado que la disponibilidad y el balance de nutrientes son críticos para un crecimiento vigoroso post-germinación. Se observó que el desarrollo *in vitro* de las plántulas fue superior cuando se empleó el medio MS a 50%, evidenciando, correlaciones positivas entre la concentración de estos últimos con la tasa de crecimiento en plántulas (Chaves *et al.*, 2021).

La implicación práctica es fundamental para el protocolo de micropropagación: la fase de crecimiento post-germinación de *T. valdezianus* debe realizarse obligatoriamente en medio MS al 50% para obtener plántulas robustas y bien desarrolladas. Esta elección asegura no solo un crecimiento vertical adecuado, sino también un desarrollo metabólico completo que prepara a las plántulas para las etapas subsecuentes de multiplicación y aclimatación, maximizando así las tasas de supervivencia.

#### **4.2.2.2 Longitud de raíz (Lr)**

La prueba de Tukey para la variable longitud de raíz (Lr) reveló que el Factor  $A_1$  (medio MS al 50%) promovió una mayor longitud radicular en comparación con el Factor  $A_0$  (medio con agar al 0.6% y 87.64 mM de sacarosa). El tratamiento  $A_1$

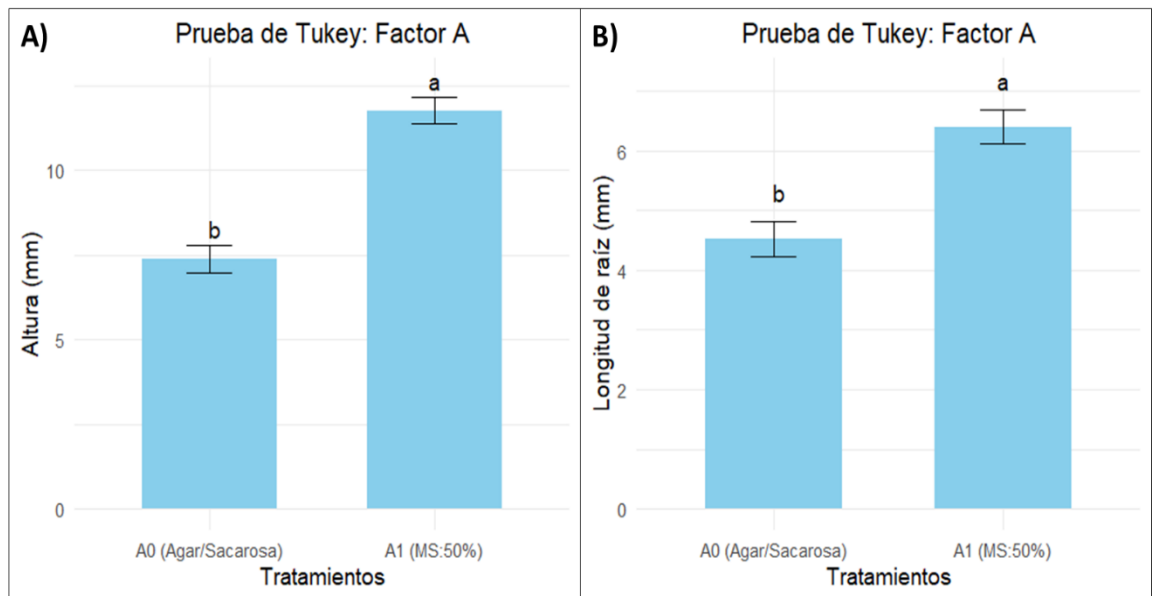
alcanzó una media ajustada de 6.40 mm, significativamente superior a la de A<sub>0</sub> (4.53 mm), lo que indica que las concentraciones de sales del medio MS al 50% proporcionaron condiciones más favorables para el desarrollo radicular (**Figura 10**).

Este resultado se respalda por la función esencial que cumple un medio mineral completo como el MS al proveer los nutrientes y cofactores necesarios para la división y elongación celular (Murashige y Skoog, 1962). La ventaja del medio MS al 50% radica en la capacidad de proporcionar un equilibrio más adecuado de sales minerales (particularmente nitrógeno, fósforo y potasio) que son esenciales para la división y diferenciación celular en la raíz (Bloom *et al.*, 2002). Bajo esta lógica el desarrollo positivo de las raíces podría deberse a la adecuada cantidad de amonio y nitrato, proporcionando así el nitrógeno necesario para la biosíntesis, la señalización y el transporte de auxinas en las plantas (Perveen *et al.*, 2011). Por otra parte, la relación nitrato/amonio optimizada en el MS al 50% promueve un pH rizosférico y el potencial redox que regula la proliferación de las células radiculares y las propiedades mecánicas. El resultado neto es que las raíces proliferan en zonas del suelo ricas en nitrógeno (Bloom *et al.*, 2002).

Este hallazgo concuerda consistentemente con investigaciones previas en cactáceas. Por ejemplo, en *Opuntia ficus-indica* y *Peniosereus greggii*, el medio MS al 50% incrementó significativamente tanto la longitud como la densidad radicular comparado con medios básicos o medios con mayores concentraciones (El finti *et al.*, 2013; Vega *et al.*, 2008). La importancia del balance en la concentración del medio de cultivo coincide con lo reportado por George *et al.* (2008) que a mayor nivel de nutrientes se incrementa el potencial osmótico y por ende se suprime la inducción de raíces.

Por lo tanto, el uso de medio MS al 50% durante la fase post-germinación es indispensable para desarrollar un sistema radicular robusto y funcional. Esta elección asegura no solo una mayor longitud radical, sino también una arquitectura radicular más eficiente en la absorción de agua y nutrientes, mejorando

sustancialmente las tasas de supervivencia durante el crítico proceso de aclimatación *ex vitro*.



**Figura 10. Resultados de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor A composición del medio de cultivo en la germinación *in vitro* de *T. valdezianus*; (A) comparación de la altura de las vitroplántulas; (B) longitud de la raíz.**

#### 4.2.3 Efecto de la presencia o ausencia de ácido giberélico (Factor B)

##### 4.2.3.1 Altura de vitroplanta (A1)

El tratamiento con AG<sub>3</sub> (B<sub>1</sub>) registró una altura de vitroplantas significativamente mayor en comparación con el tratamiento sin AG<sub>3</sub> (B<sub>0</sub>). Según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), el tratamiento B<sub>1</sub> alcanzó una media ajustada de 11.37 mm, mientras que B<sub>0</sub> presentó 7.78 mm, ubicándose en grupos distintos ("a" y "b"). Este resultado confirma que la aplicación de ácido giberélico favorece el alargamiento de las plántulas durante la germinación *in vitro* (**Figura 11**).

La marcada superioridad del tratamiento con AG<sub>3</sub> puede atribuirse a su acción como regulador clave en los procesos de elongación celular. El AG<sub>3</sub> estimula la expresión

de genes que codifican para enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilasas y proteasas, facilitando la movilización de reservas endospermicas (Liao *et al.*, 2025). Simultáneamente, AG<sub>3</sub> estimula la biosíntesis de expansinas y xyloglucano endotransglucosilasas (XET/XTH), enzimas que remodelan los enlaces de la pared celular, facilitando su expansión y contribuyendo al crecimiento y expansión celular (Luo *et al.*, 2024). Además, el AG<sub>3</sub> regula inhibiendo a las proteínas DELLA, represoras del crecimiento, liberando así el potencial de elongación celular en los meristemos apicales (Waadt *et al.*, 2022).

Este hallazgo concuerda con numerosos reportes sobre la acción de las giberelinas en sistemas *in vitro*. En especies de Cactáceas, la suplementación con ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) ha demostrado efectos positivos en el crecimiento de plántulas. Por ejemplo, en *Opuntia* spp., la adición de AG<sub>3</sub> al medio MS al 25% la ruptura de la latencia de la semilla y el aumento de la actividad amilolítica durante la germinación (Ochoa *et al.*, 2015). De manera similar, estudios en *Stenocereus queretaroensis* y *Cephalocereus senilis* demostraron AG<sub>3</sub> promovió significativamente la elongación del hipocótilo. Estos resultados respaldan el papel de las giberelinas como promotores del crecimiento en cactáceas durante las etapas tempranas de desarrollo e incluso puede reactivar crecimiento en individuos longevos de 100 años o más de *Stenocereus queretaroensis* que ya habían cesado el crecimiento del tallo (Pimienta *et al.*, 1998; Soriano, 2006).

La adición de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo para *T. valdezianus* durante la fase de germinación es esencial para obtener plántulas bien desarrolladas. Esta estrategia no solo acelera el crecimiento vertical, sino que también genera plántulas más vigorosas y mejor preparadas para las etapas subsecuentes de multiplicación y aclimatación.

#### **4.2.3.2 Longitud de raíz (Lr)**

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con AG<sub>3</sub> (B<sub>1</sub>) y sin AG<sub>3</sub> (B<sub>0</sub>) en la longitud de raíz (Lr), ya que ambos se ubicaron dentro del mismo grupo estadístico ("a") según la prueba de Tukey ( $p > 0.05$ ). El tratamiento B<sub>1</sub>

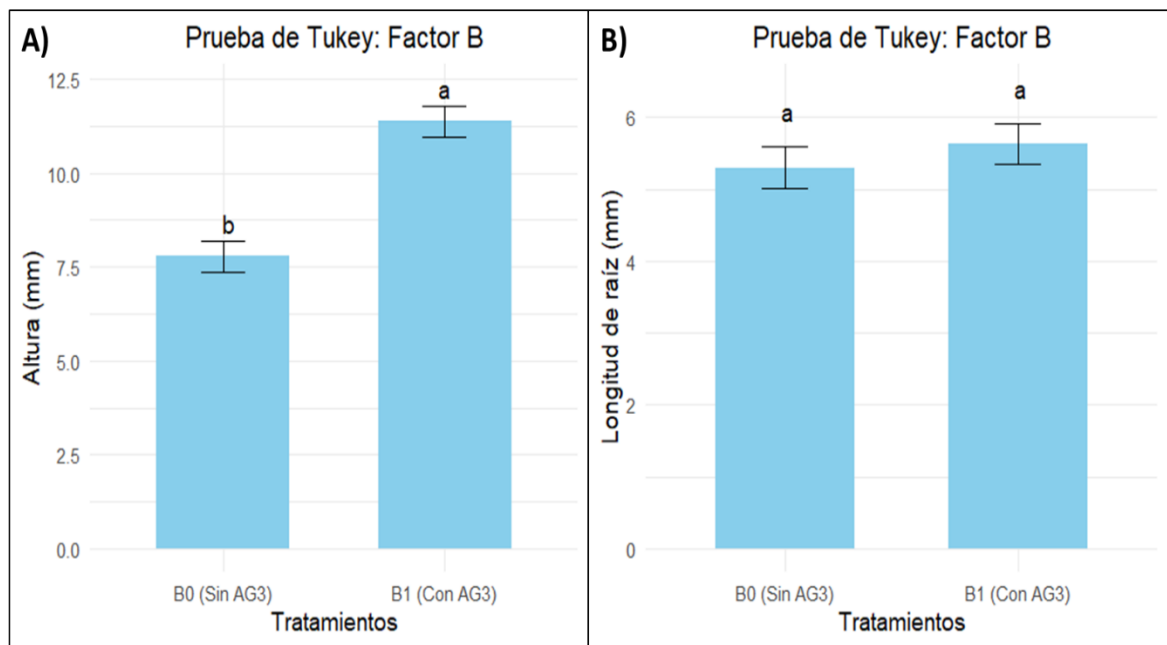
alcanzó una media ajustada de 5.63 mm, mientras que B<sub>0</sub> registró 5.30 mm, lo que indica que la adición de giberelina no ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento radicular de las vitroplántulas. Esto sugiere que, a diferencia de la altura de plántula, la aplicación de ácido giberélico no tuvo un efecto claro sobre el desarrollo radicular durante la germinación *in vitro* (**Figura 11**).

La ausencia de respuesta radicular al AG<sub>3</sub> puede atribuirse a factores fisiológicos como una alta sensibilidad de las raíces al ácido giberélico a concentraciones extremadamente bajas (Tanimoto, 2012). Los resultados para *Turbinicarpus valdezianus* sugiere que el ácido giberélico no tiene efecto en la elongación de la raíz o que esta es muy sensible al ácido giberélico y con concentraciones endógenas de giberelinas cercanas al nivel de saturación, lo que limitaría la respuesta a aplicaciones exógenas (Tanimoto 2012). Concentraciones muy bajas de ácido giberélico son suficientes para saturar la elongación de las raíces, pero no la del tallo (Ramon y Illouz-Eliaz, 2021). Además, el ácido giberélico redirige cómo se usa el carbono y el nitrógeno, pero su función clave es acoplar el metabolismo energético con la expansión celular, en otras palabras, ácido giberélico actúa como un “interruptor metabólico” que asegura que los recursos disponibles se inviertan en crecer, en lugar de quedarse almacenados (Ribeiro *et al.*, 2012). El desarrollo radicular está predominantemente regulado por auxinas y citoquininas, que controlan la división y elongación celular en los meristemos radicales (Street *et al.*, 2016; Rivas *et al.*, 2022).

Este resultado coincide con lo reportado en otras cactáceas como *Echinocactus grusonii* y *Turbinicarpus alonsoi*, donde la aplicación de AG<sub>3</sub> no mostró efectos significativos en el desarrollo radicular, mientras que en *Selenicereus grandiflorus*, y *Astrophytum asterias* se observó incluso una ligera inhibición (Esteves y Esquibel, 2010; Ritthidechrat y Anuwong, 2023). Estudios en modelos como *Arabidopsis* han demostrado que las giberelinas tienen un papel secundario en la organogénesis radical, donde las auxinas ejercen el control primario. La especificidad tisular de la

respuesta a giberelinas parece ser un patrón conservado en diversas especies (Fu y Harberd, 2003; Mäkilä *et al.*, 2023).

Desde la perspectiva del protocolo de micropropagación, este hallazgo sugiere que la adición de AG<sub>3</sub> no es necesaria para promover el desarrollo radicular durante las fases de germinación. Los recursos pueden optimizarse enfocándose en otros reguladores o condiciones que sí afecten positivamente el sistema radical. Sin embargo, considerando su beneficio en el crecimiento aéreo, su uso podría justificarse cuando se busque un equilibrio entre desarrollo foliar y radical.



**Figura 11. Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor B presencia o ausencia de AG<sub>3</sub> en la germinación *in vitro* de *T. valdezianus*; (A) comparación de la altura de las plántulas; (B) longitud de la raíz.**

#### 4.2.4 Efecto combinado (interacción AxB)

##### 4.2.4.1 Altura de brotes (Al)

El análisis post hoc de Tukey mostró que el tratamiento T4 (A<sub>1</sub>:B<sub>1</sub>), que combinó el medio MS al 50% con la aplicación de AG<sub>3</sub>, presentó la mayor altura de vitroplántulas (emmean = 14.65 mm), ubicándose en un grupo estadísticamente

distinto (“a”) respecto a los demás tratamientos. En contraste, T3 (A<sub>1</sub>:B<sub>0</sub>) alcanzó una media de 8.88 mm (grupo “ab”), T2 (A<sub>0</sub>:B<sub>1</sub>) obtuvo 8.08 mm (grupo “b”), y T1 (A<sub>0</sub>:B<sub>0</sub>) registró la menor altura (6.68 mm, grupo “c”). Este resultado demuestra que ambos factores actúan sinérgicamente para promover el desarrollo de *Turbinicarpus valdezianus* (**Figura 12**).

El análisis clave de la interacción AxB para AI reveló que estos factores no actúan de manera independiente: tanto el medio de cultivo como el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) influyen significativamente en el crecimiento de plántulas de *Turbinicarpus valdezianus*. En el caso de la altura (AI), el medio MS al 50% (A<sub>1</sub>) promovió un crecimiento superior en comparación con agar-sacarosa (A<sub>0</sub>), reflejando la importancia de un suministro adecuado de nutrientes (Murashige & Skoog, 1962). En particular, el medio MS aporta fuentes inorgánicas de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), magnesio, calcio y microelementos esenciales para la biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y fitohormonas endógenas, los cuales son fundamentales para sostener la actividad meristemática y el alargamiento celular en tejidos jóvenes (Zhang *et al.*, 2024).

La sinergia observada puede explicarse por la complementariedad de los mecanismos de acción: el medio MS al 50% proporciona los sustratos metabólicos (carbono, nitrógeno, cofactores) necesarios para la biosíntesis de proteínas y la expansión celular (Murashige & Skoog, 1962). Mientras que el AG<sub>3</sub> actúa a nivel molecular activando las vías de señalización que promueven la elongación. Esta hormona estimula la degradación de los represores DELLA mediante la vía del receptor GID1, permitiendo la transcripción de genes asociados a la expansión celular (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Entre los genes inducidos se encuentran aquellos que codifican expansinas y enzimas de remodelación de la pared celular como las *xyloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas* (XTH), que facilitan la extensibilidad de las paredes primarias y, por tanto, la elongación del eje hipocotilar y de los tejidos meristemáticos (Luo *et al.*, 2024).

Diversos estudios en cactáceas han reportado efectos similares, donde la aplicación de ácido giberélico ( $AG_3$ ) estimuló significativamente la elongación del tallo y la actividad del clorénquima, evidenciando una mayor sensibilidad de los tejidos fotosintéticos a la hormona. Asimismo,  $AG_3$  modula el metabolismo del carbono, incrementando la asimilación y utilización de azúcares en tejidos en desarrollo, como se observó en *Stenocereus queretaroensis*, donde la elongación del tallo se acompañó de una disminución de azúcares almacenados durante el crecimiento activo (Arteca y Dong, 1981; Pimienta y Nobel, 1995; Murcia *et al.*, 2016).

La concentración del medio MS al 50% puede haber favorecido el crecimiento al disminuir la fuerza iónica y evitar efectos osmóticos negativos, creando un ambiente más equilibrado para la absorción de nutrientes y la acción del fitoregulator. Esta condición ha sido reportada como óptima para la elongación y regeneración de brotes en varias cactáceas micropropagadas, donde un exceso de sales minerales puede generar estrés osmótico o inhibir la expansión celular (Sanchez-Olate *et al.*, 2004; George *et al.*, 2008).

#### **4.2.4.2 Longitud de raíz (Lr)**

De manera similar, la elongación radicular (Lr) mostró una dependencia significativa del medio de cultivo. Las plántulas cultivadas en MS al 50% ( $A_1$ ) desarrollaron raíces más largas (emmean = 6.40 mm) que aquellas en agar-sacarosa ( $A_0$  = 4.53 mm). Por sí sola, la aplicación de  $AG_3$  no generó un efecto significativo sobre la longitud de raíz ( $B_1$  = 5.63 mm vs.  $B_0$  = 5.30 mm). Sin embargo, la combinación MS al 50% +  $AG_3$  ( $A_1:B_1$ , T4) produjo la mayor elongación radicular (6.96 mm), ubicándose en el grupo estadístico “a”, y superando tanto a MS sin  $AG_3$  ( $A_1:B_0$ , T3 = 5.84 mm) como a los tratamientos en agar-sacarosa con o sin  $AG_3$  ( $T_2 = A_0:B_1$  = 4.29 mm;  $T_1 = A_0:B_0$  = 4.76 mm). Estos resultados indican un efecto sinérgico entre el medio MS diluido y la giberelina en la promoción del crecimiento radicular (**Figura 12**).

Esto confirma nuevamente la relación sinérgica donde el aporte nutricional del medio MS provee los precursores metabólicos y la energía necesaria para que la señal hormonal del  $AG_3$  se traduzca eficientemente en elongación celular (Cosgrove



y Sovonick-Dunford, 1989; Davies, 2010; Taiz *et al.*, 2021). Fisiológicamente, las giberelinas (GA) no sólo estimulan el crecimiento vegetativo, sino que también modulan la eficiencia metabólica de las plantas (Zhang *et al.*, 2024). Este fitoregulador induce la expresión de transportadores de nutrientes en la rizodermis, facilitando la asimilación de nitrógeno y fósforo del medio MS. En particular, las GA promueven la absorción de nitrógeno al inducir la expresión de transportadores de nitrato (*NRT*) y de enzimas clave en su asimilación, como el nitrato reductasa (*NR*), la glutamina sintetasa (*GS*) y el glutamato sintasa (*GOGAT*). Diversos estudios han demostrado que el déficit de giberelinas reduce la captación de nitrato, lo que desencadena respuestas de estrés caracterizadas por la acumulación de antocianinas y la aparición de clorosis (Wang *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2025; Liu *et al.*, 2025).

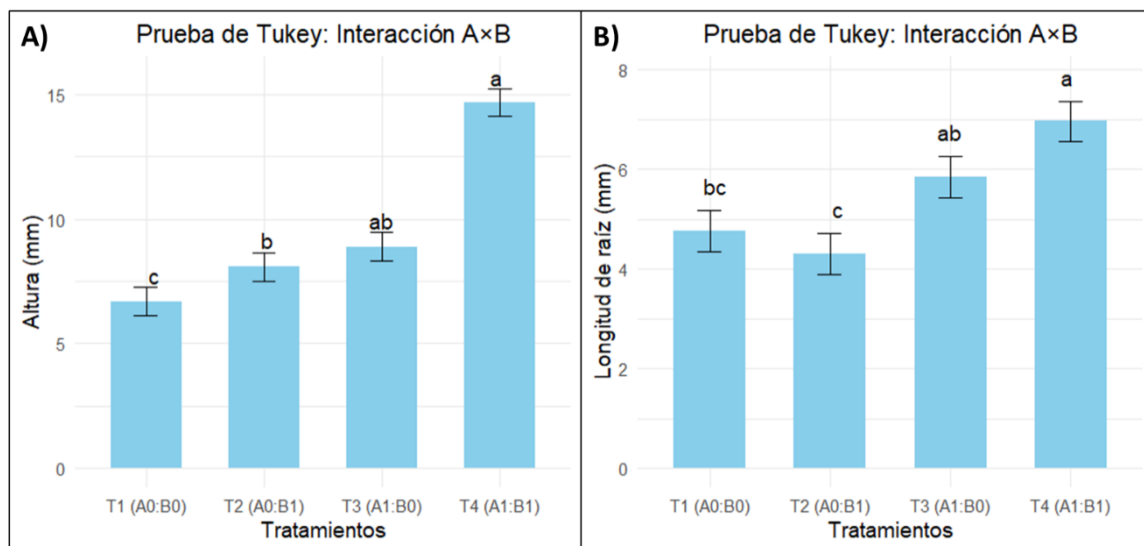
Esto concuerda con lo reportado en diferentes especies de *Opuntia* donde el empleo de medios nutritivos como Gamborg o MS suplementados con AG<sub>3</sub>, mostraron mejores resultados en comparación con sustratos inertes lo que confirma que la acción del AG<sub>3</sub> depende no solo de la señal hormonal, sino también de la disponibilidad de nutrientes (Ochoa *et al.*, 2015).

Este hallazgo posee implicaciones cruciales para el diseño de protocolos: la efectividad del AG<sub>3</sub> en el desarrollo radicular depende críticamente de la composición del medio de cultivo. Para maximizar el crecimiento radical, se recomienda implementar la combinación sinérgica de medio MS al 50% con AG<sub>3</sub> (T4), ya que produce un efecto superior al uso de cualquiera de estos factores por separado. Esta estrategia es particularmente valiosa cuando se busca establecer plántulas con sistemas radiculares robustos para aclimatación.

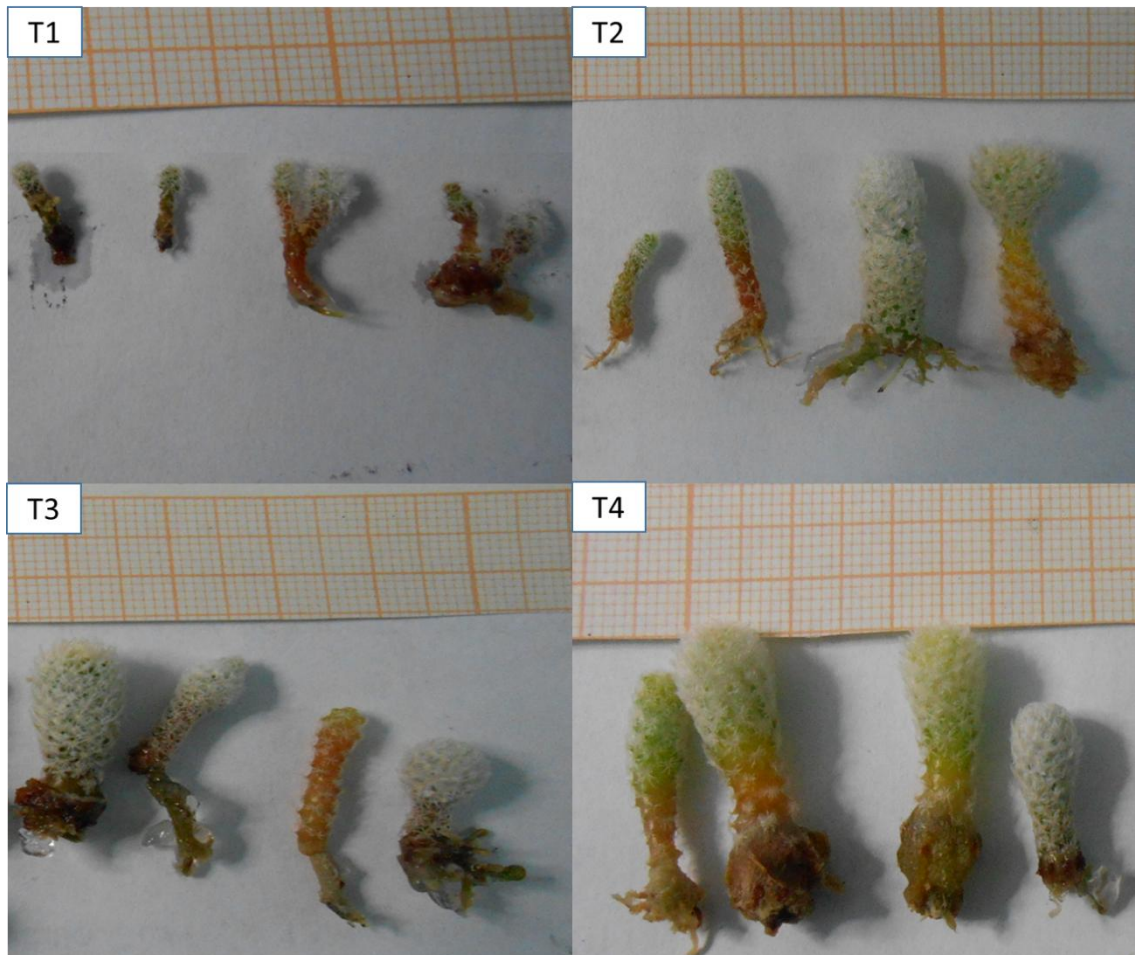
Los resultados evidencian que los Fitoreguladores requieren de un sustrato metabólicamente adecuado para expresar su máximo potencial y resalta la interacción sinérgica entre nutrición y señal hormonal (Murashige, 1974; Cosgrove & Sovonick-Dunford, 1989).

En conjunto, la combinación del medio MS al 50% y AG<sub>3</sub> favorece una respuesta coordinada en *T. valdezianus*, donde la disponibilidad nutricional y la señal hormonal interactúan positivamente para potenciar los procesos de división y elongación celular, resultando en plántulas con mayor altura y vigor. Esta interacción significativa entre el medio de cultivo y el AG<sub>3</sub> también se refleja en el desarrollo radicular, ya que la combinación MS al 50% + AG<sub>3</sub> representa el tratamiento óptimo para promover la elongación de las raíces, demostrando que el efecto de las giberelinas sobre el sistema radical está modulado por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico y las observaciones fisiológicas, la hipótesis H<sub>1</sub> se cumple. La combinación del medio MS al 50% con AG<sub>3</sub> representa el tratamiento óptimo para promover tanto la altura como la longitud de raíz, lo que respalda que la manipulación controlada de factores nutricionales y hormonales es efectiva para optimizar el desarrollo *in vitro* de *T. valdezianus*.



**Figura 12. Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para interacción Factores (A:B) en la germinación *in vitro* de *T. valdezianus*; (A) comparación de la altura de las plántulas; (B) longitud de la raíz.**



**Figura 13. Efecto de los cuatro tratamientos en el desarrollo morfológico de vitroplantas de *T. valdezianus*. (A) T1= 0.6% agar + 87.64 mM C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; (B) T2=0.6% agar + 87.64 mM C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> + 8.65  $\mu$ M de (AG<sub>3</sub>); (C) T3= MS (Murashige-Skoog, 1962) al 50 %; (D) T4= MS 50% + 8.65  $\mu$ M de AG<sub>3</sub>.**

### **4.3 Ensayo de multiplicación (Inducción de brotes)**

#### **4.3.1 Análisis de varianza Inducción de brotes**

##### **4.3.1.1 Numero de brotes (Nb)**

El análisis de varianza (ANOVA) factorial 2x2 mostró que el número de brotes por explante (Nb) fue ligeramente significativo e influenciado por el tipo de fitoregulador ( $p = 3.8727 \times 10^{-2}$ ) y altamente significativo en la interacción entre concentración y tipo

de fitoregulador ( $p = 8.02 \times 10^{-4}$ ). No se encontró un efecto significativo del factor concentración por sí solo ( $p = 1.530 \times 10^{-1}$ ) (**Cuadro 10**).

#### 4.3.1.2 Altura de brotes (Al)

Inicialmente, se realizó un ANOVA factorial tradicional para esta variable. Los resultados indicaron un efecto altamente significativo para el Factor (A)  $p=5.23 \times 10^{-5}$  y ligeramente significativo para el Factor (B) ( $p=0.044$ ), mientras que la interacción A:B no fue significativa ( $p=0.984$ ) (**Cuadro 10**).

**Cuadro 10. Resultados del análisis de varianza factorial (ANOVA 2x2) para las variables Numero de brotes (Nb) y Altura de brotes (Al).**

Variables		Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Nb</b>	A (Concentración)	26.3	13.76	2.052	<b>0.153081</b>
	B (Tipo de Fitoregulador)	28.9	28.92	4.31	<b>0.038727 *</b>
	AxB	76.9	76.94	11.469	<b>0.000802 ***</b>
<b>Al</b>	A (Concentración)	26.3	26.276	16.843	<b>5.23e-05 ***</b>
	B (Tipo de Fitoregulador)	6.4	6.382	4.091	<b>0.044 *</b>
	AxB	0	0.001	0	<b>0.984</b>

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

#### 4.3.2 Pruebas de normalidad para número de brotes y altura de brotes

Se verificaron los supuestos del modelo mediante la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas.

Numero de brotes (Nb).- Los resultados indicaron que los residuos del modelo se distribuyeron normalmente ( $p = 0.2679$ ) y no presentaron heterocedasticidad ( $p = 0.3052$ ) para la variable (Nb), por lo que se consideró que el modelo ANOVA se ajusta adecuadamente a los datos (**Cuadro 11**).

Altura de brotes (Al).- El análisis estadístico reveló violaciones al supuesto de normalidad del modelo ANOVA Shapiro-Wilk ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ); aunque se cumplió la homogeneidad de varianzas (Levene,  $p < 1.75 \times 10^{-3}$ ) (**Cuadro 11**).

**Cuadro 11. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para Numero de brotes (Nb) y Altura de brotes (Al).**

<i>Variable</i>	<i>Shapiro-Wilk normality test</i>	<i>Levene's Test for Homogeneity of Variance</i>
<b>Nb</b>	<b>W = 0.99398 p-value = 0.2679</b>	<b>F value = 1.2127 Pr(&gt;F) = 0.3052</b>
<b>Al</b>	<b>W = 0.97235 p-value = 2.2e-16</b>	<b>F value = 1.5297 Pr(&gt;F) = 0.2118</b>
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

Dado que los residuos del modelo no cumplieron con el supuesto de normalidad para la variable, Altura de brotes (Al), se aplicó una transformación Box-Cox ( $\lambda = -0.30$ ). Sin embargo, a pesar de que la transformación mejoro marginalmente la homogeneidad de varianzas ( $p < 0.09872$ .), los residuos transformados continuaron sin ajustarse a una distribución normal ( $p < 7.132e-13$ ) (**Cuadro 12**).

**Cuadro 12. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para Altura de brotes (Al).**

<i>Variable</i>	<i>Shapiro-Wilk normality test</i>	<i>Levene's Test for Homogeneity of Variance</i>
<b>Al</b>	<b>W = 0.90575 p-value = 7.132e-13</b>	<b>F value = 2.1121 Pr(&gt;F) = 0.09872.</b>
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

En consecuencia, se utilizó un método ANOVA no paramétrico de rangos alineados (ART) para la variable (Al), este método permite analizar diseños factoriales sin requerir pruebas de normalidad. Los resultados mostraron efectos significativos del factor A (concentración de fitoreguladores;  $p < 3.7224e-10$ ) y del factor B (tipo de fitoregulador;  $p < 1.53e-03$ ), sin interacción significativa (AxB;  $p = 2.01e-01$ ) (**Cuadro 13**).

**Cuadro 13. Resultados modelo ANOVA no paramétrico de rangos alineados (ART) para Altura de brotes (Al).**

Analysis of Variance of Aligned Rank Transformed Data			
Variables		F value	Pr(>F)
Al	A (Concentración)	42.0013	3.7224e-10 ***
	B (Tipo de Fitoregulador)	10.2349	0.0015251 **
	A×B	1.6449	0.20064
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1			

### 4.3.3 Efectos de los niveles de concentración (Factor A)

#### 4.3.3.1 Número de brotes (Nb)

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (2.5 + 0.25 mg/L) y (5.0 + 0.50 mg/L), lo que indica que incrementar la concentración del fitoregulador no produjo un aumento significativo en la brotación; ya que ambos compartieron la misma letra estadística ("a") (Valle, 2021) (**Figura 14**).

En el cultivo *in vitro*, las fitohormonas actúan como moléculas de señalización que regulan procesos fisiológicos en las plantas, y su efectividad puede verse limitada por la capacidad de los receptores para interactuar con ellas (George *et al.*, 2008). Los resultados sugieren que la concentración más baja (2.5 + 0.25 mg/L) fue suficiente para saturar los receptores hormonales y desencadenar la respuesta máxima de división celular y proliferación de brotes (Arias-Zabala *et al.*, 2009; Valle, 2021).

Estos resultados coinciden con los reportados por Avalos (2010), quien reporta que al duplicar la concentración de reguladores no incrementó significativamente la tasa de multiplicación en *Myrciaria dubia* y no encontró diferencias significativas para el efecto de las concentraciones sugiriendo la existencia de un umbral de respuesta específico para el género o la especie.

Alternativamente, es factible que la concentración más alta no haya generado una respuesta superior e incluso en los resultados se observa un pequeño decrecimiento no significativo de 7.61 a 7.19 con la concentración alta.

Esto debido en gran medida a que se aproxima o alcanza un nivel de fitotoxicidad, donde un incremento en la concentración hormonal comienza a tener efectos inhibitorios en lugar de promotores (Arias-Zabala *et al.*, 2009). Estos efectos antagónicos podrían haber resultado en una respuesta final similar a la de la concentración más baja.

Por otra parte, George *et al.*, (2008) afirman que las respuestas de los explantes dependen tanto de la sensibilidad del tejido, así como del equilibrio hormonal de citoquininas y auxinas. La falta de diferencias entre concentraciones dentro de cada fitoregulador también podría indicar que la señal hormonal podría ser determinante.

Estos dos grupos de fitohormonas citoquinina - auxina actúan de forma sinérgica o antagónica en el control de las actividades meristemáticas, modulando la transición entre división celular y diferenciación; de esta manera, un equilibrio adecuado permite mantener la fase meristemática activa (Moubayidin *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011). Durante la división celular asimétrica la auxina reprime la señalización de las citoquininas en zonas específicas del embrión (Su *et al.*, 2011). Por lo tanto, una estimulación más marcada de la auxina, desplazar la señalización hacia callogénesis (Skoog y Miller, 1957).

En base a esto, la relación de concentración utilizada en los tratamientos de este estudio ( $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  citoquinina +  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auxina y  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  citoquinina +  $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auxina) podría afectar la proliferación de brotes al incrementar levemente la presencia de auxina, contribuyendo a una señal hormonal más antagónica que sinérgica.

Esto concuerda con los resultados reportados por Palacios *et al.* (2016) en *Turbinicarpus valdezianus*, donde la proliferación máxima de brotes se observó con KIN sola, sin auxina. En su estudio, los explantes apicales alcanzaron hasta 11,75

brotos/explante y los laterales 4,50 brotes/explante, mientras que en ausencia de PGRs la brotación fue prácticamente nula ( $\sim 1,95$  brotes/explante). Esto sugiere que la presencia de auxina, aun en bajas concentraciones, puede inhibir parcialmente la inducción de brotes, aunque simultáneamente podría favorecer otros procesos como formación de callo.

#### **4.3.3.2 Altura de brotes (Al)**

El análisis post hoc de Tukey reveló que la concentración baja de citocinina: auxina ( $2.5 + 0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) promovió una altura significativamente mayor de los brotes, con una media estimada de  $6.23 \text{ mm} (\pm 0.10 \text{ SE})$ , en comparación con la concentración alta ( $5.0 + 0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), que presentó una media de  $5.64 \text{ mm} (\pm 0.10 \text{ SE})$ . Los tratamientos se ubicaron en grupos estadísticos distintos (“a” y “b”), indicando que concentraciones más bajas de fitoreguladores favorecen un mayor alargamiento de los brotes *in vitro*. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). Lo cual sugiere que concentraciones menores de reguladores del crecimiento pueden ser más efectivas al crear un ambiente hormonal menos estresante que permite para estimular el crecimiento en altura en esta etapa del cultivo *in vitro* un desarrollo más balanceado (Lee *et al.*, 2025) (**Figura 14**).

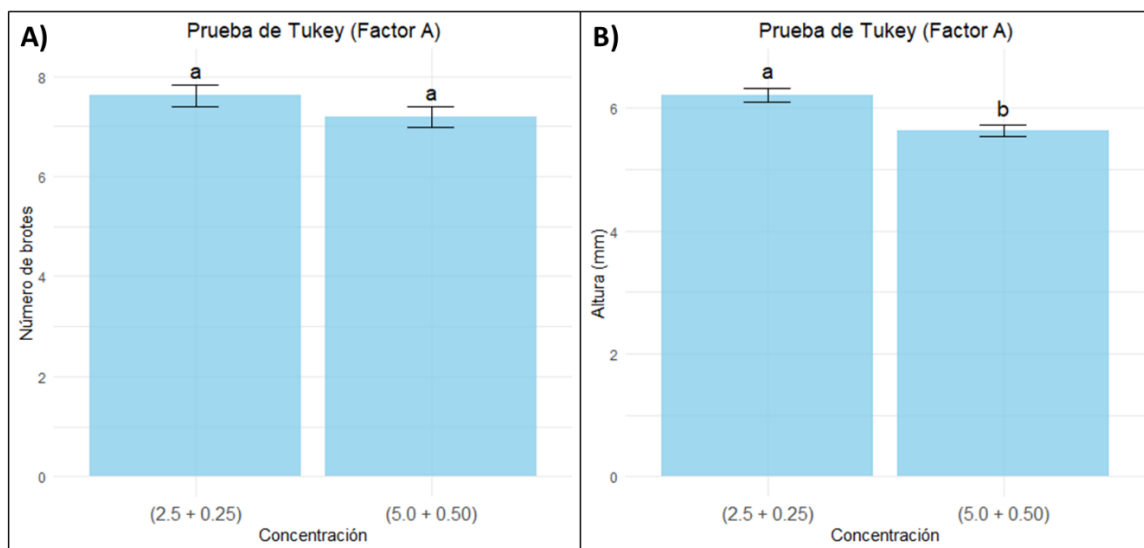
Este resultado indica claramente un efecto inhibitorio de las altas concentraciones de fitoreguladores sobre el crecimiento en longitud (Sanchez-Olate *et al.*, 2004). Las altas concentraciones de citoquininas (BA o KIN) y auxinas (ANA o AIB) probablemente superaron el umbral óptimo, generando un estrés hormonal que suprimió el proceso de elongación celular llevando a la formación de brotes más compactos (George *et al.*, 2008; Jana *et al.*, 2013; Mohamad *et al.*, 2022).

Fisiológicamente puede explicarse porque altas concentraciones de citocininas exógenas inhibe fuertemente la actividad de la citoquinina oxidasa, lo que aumenta los niveles endógenos de citoquininas naturales, provocando un desbalance hormonal (Huetteman y Preece, 1993). Limitando la elongación celular y la expansión de la pared celular y favoreciendo el cambio de células meristemáticas a células diferenciadas y por ende la formación de brotes compactos.



Por otra parte, aunque las auxinas son esenciales para regular la división y elongación celular, pueden ser fitotóxicas en altas concentraciones y, sin control homeostático, la hormona podría acumularse fácilmente hasta alcanzar niveles tóxicos (Taiz *et al.*, 2021). Así como generar respuestas desbalanceadas como la proliferación descontrolada de callo, inhibición del crecimiento o incluso necrosis. Por eso, las células vegetales necesitan regular finamente sus niveles internos de auxina (Chamorro *et al.*, 2007; Garcia-Osuna *et al.*, 2011)

Este fenómeno ha sido corroborado en distintas especies, en *Syringa koreensis*, la aplicación de una baja concentración de ANA incrementó el número de brotes, mientras que el uso de AIB promovió la longitud de los mismos; sin embargo, concentraciones más altas de AIB tuvieron un efecto negativo sobre la elongación (Lee *et al.*, 2025). De manera similar, en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* var. Isd 18), se observó que la combinación de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA produjo el mayor número de brotes por cultivo (2.61) y la mayor longitud de brotes (2.37 cm), mientras que dosis más altas ( $1.0 \text{ BA mg}\cdot\text{L}^{-1} + 0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  AIA) redujeron significativamente tanto el número como la longitud de los brotes (Rahman *et al.*, 2018).



**Figura 14. Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor A concentración del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de**

***T. valdezianus*; (A) comparación en Numero de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al).**

**4.3.4 Efectos del tipo de Fitoregulador (Factor B)**

**4.3.4.1 Número de brotes (Nb)**

La prueba de Tukey para el factor B mostró diferencias significativas entre los tratamientos en el número de brotes (Nb). El tratamiento que combina (KIN + AIB) presentó un mayor número de brotes por explante (7.67) comparado con BA + ANA (7.04), indicando que la combinación de Kinetina con Ácido Indolbutirico resultó más efectiva en la inducción de brotes (**Figura 15**).

La kinetina (KIN) es una citoquinina encontrada naturalmente en gran diversidad de organismos, aunque en la actualidad existe una preferencia por otras citoquininas como la zeatina o el 6-bencilaminopurina (BA), así como por uso de miméticos de tipo CAD (Ptak *et al.*, 2023; Mazinani *et al.*, 2025). No obstante, presenta ventajas que justifican su empleo en cultivo *in vitro*. Su amplio historial de uso en diferentes especies, además de la relativa estabilidad en formulaciones estándar y eficacia probada en la multiplicación de brotes en diversos sistemas (Hart *et al.*, 2016).

En este estudio el tratamiento con KIN promovió un número significativamente mayor de brotes por explante en comparación con BA. Esto sugiere que, en *T. valdezianus*, la kinetina posee una actividad biológica más adecuada o una mejor relación sinérgica con la auxina, promoviendo una división celular más eficiente en los meristemos.

Esta sinergia ha sido descrita previamente, ya que la kinetina (6-furfurilaminopurina) es considerada relativamente inmóvil dentro de las plantas; sin embargo, experimentos con kinetina marcada con <sup>14</sup>C en plantas de frijol decapitadas mostraron que la presencia de ácido indolacético (AIA) favorece su movimiento en el tallo, evidenciando que la auxina potencia el transporte y la eficacia de la kinetina (Seth *et al.*, 1966).

Desde un punto de vista fisiológico la citoquinina, KIN, modula la transición hacia células diferenciadas, mientras que la auxina, en este caso AIB, estimula la división celular en el meristemo. La proporción de estas hormonas parece favorecer la prolongación de la fase meristemática sin inducir una diferenciación prematura, lo que permite que cada explante genere un mayor número de brotes (Moubayidin *et al.*, 2009).

La kinetina (KIN), aunque considerada menos activa que BA en términos absolutos, ha mostrado en varias especies una mayor compatibilidad fisiológica, favoreciendo un desarrollo más equilibrado de los brotes (Bozsó y Barna, 2021). BA es una citocinina sintética ampliamente utilizada en la micropropagación debido a su alta eficacia en la inducción de brotes (George *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha reportado que su aplicación puede generar efectos secundarios indeseables, como hiperhidratación (vitrificación), inhibición del crecimiento y formación de tejidos anómalos, especialmente en *T. valdezianus* (García-Osuna *et al.*, 2011). Con base en ello, se plantea la hipótesis de que, en el presente estudio, la alta potencia del BA no resultó la más adecuada para *T. valdezianus*, o bien que la KIN presentó una mejor afinidad con el metabolismo de la especie, promoviendo un patrón de multiplicación más eficiente y fisiológicamente estable (Chamorro *et al.*, 2007).

Con respecto a las auxinas AIB posee algunas ventajas comparada con otras auxinas como AIA teniendo una acción más prolongada y estable (Ludwig-Müller, 2011). Resistente a la degradación por microorganismos, así como una toxicidad relativamente baja y un mayor tiempo de permanencia en el sitio de aplicación (Mesén, 1998; Gehlot y Arya, 2014; Ramírez, 2019). También se ha reportado que el AIB sufre una foto degradación más lenta en medios sólidos, teniendo un 40% de ingrediente activo estable tras 30 días bajo luz (Nissen y Sutter, 1988; Qamar y Muneer, 2005). Además, AIB activa genes mitóticos que generalmente están regulados por auxinas, que podrían estimular la división celular (Qu *et al.*, 2019).

Por otra parte, ANA es una auxina sintética muy potente que no se oxida, pero una vez absorbidas, la tasa de degradación dentro de los tejidos vegetales suele ser más rápida, ya que no sólo está expuesta a factores físicos, sino que también está sujeta a conversión enzimática (Dunlap *et al.*, 1986). Además, aunque se utilice en concentraciones bajas, el ANA puede resultar fitotóxico o inhibir la brotación si su efecto se vuelve demasiado marcado (Paton y Scriven, 1989).

Los resultados de este trabajo son contrastantes con los encontrados por De la Rosa, (2012). En *T. valdezius subsp. albiflorus* el cual observó que la concentración óptima de BAP fue de 2.22  $\mu\text{M}$ , generando un promedio de 7,0 brotes por explante. Sin embargo, al incrementar la concentración, observó una disminución progresiva en el número de brotes, alcanzando solo 4.8–5.1 brotes a concentraciones de 5.55 y 7.38  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, en *T. valdezius* la combinación de Kinetina con AIB resultó más efectiva, generando un mayor número de brotes sin comprometer su desarrollo

La superioridad de la KIN observada en este estudio también ha sido documentada en especies como *Limonium ornamentalis* var. Misty blue donde BA a 2.0  $\text{mgL}^{-1}$  la tasa multiplicación y la calidad es baja con brotes pequeños que no llegan a diferenciarse completamente. Por el contrario, con KIN a 0.5  $\text{mgL}^{-1}$  se la multiplicación es moderada y los brotes muestran mejor calidad en su forma y tamaño, a medida que se aumenta la concentración de KIN, la tasa de multiplicación se incrementa, pero el vigor de los brotes disminuye (Chamorro *et al.*, 2007). De manera análoga, la combinación de Kinetina con AIB fue más eficiente con mayor número de brotes así, como un adecuado desarrollo, destacando la importancia de seleccionar la citocinina y concentraciones óptimas para equilibrar cantidad y calidad de los brotes.

#### **4.3.4.2 Altura de brotes (AI)**

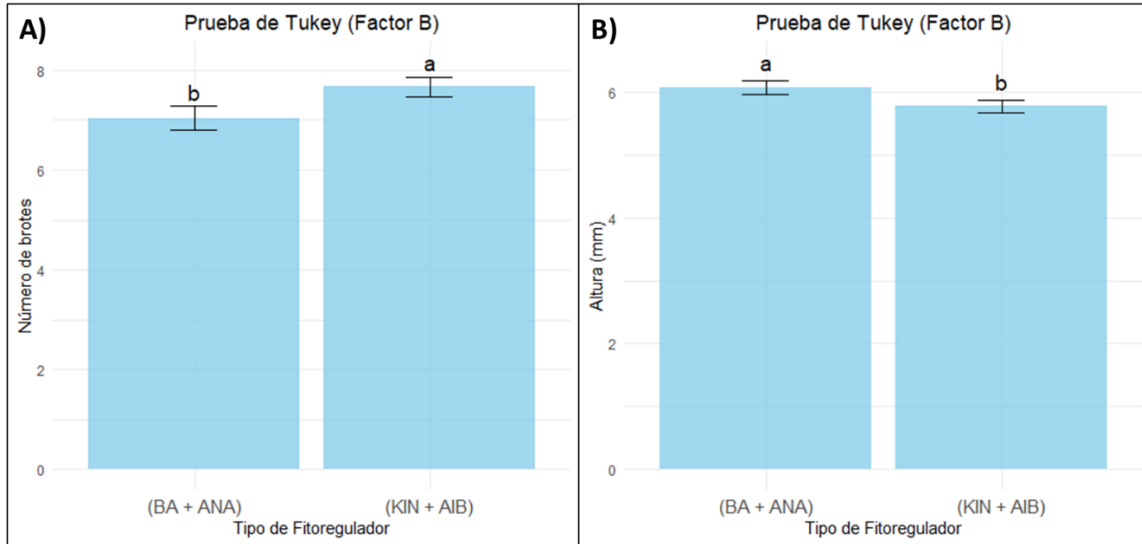
Para la altura de los brotes (AI), el análisis post hoc de Tukey indicó que las plántulas tratadas con la combinación de BA + ANA alcanzaron una altura significativamente mayor, con una media estimada de 6.08 mm ( $\pm 0.11$  SE), en comparación con

aquellas tratadas con KIN + AIB, que registraron una media de 5.79 mm ( $\pm 0.10$  SE). Ambos tratamientos se ubicaron en grupos estadísticos distintos (“a” y “b”), evidenciando que la combinación de BA y ANA favoreció un mayor crecimiento en altura de los brotes *in vitro* (**Figura 15**).

Desde un punto de vista fisiológico, este efecto podría atribuirse a que BA posee un alto grado de efectividad para estimular la división y expansión celular, especialmente cuando se combina con una auxina altamente móvil como lo es ANA (George *et al.*, 2008). Como se ha descrito anteriormente La auxina induce la división celular en el meristemo, mientras que la citoquinina controla el cambio de células meristemáticas a células diferenciadas (Moubayidin *et al.*, 2009). En este contexto para *T. valdezianus*, esta proporción hormonal podría favorecer la elongación de células individuales en lugar de inducir la formación de múltiples brotes, desplazando el equilibrio hacia crecimiento en altura más que a proliferación de brotes. En contraste la combinación de KIN+AIB favorece a un patrón de desarrollo más compacto posiblemente más enfocado en la formación de brotes múltiples que en la elongación (Kirkham y Holder, 1981).

Este fenómeno también puede interpretarse como resultado de la alta sinergia entre fitoreguladores y las concentraciones, en las que interactúan de forma positiva tanto los niveles endógenos como exógenos de citocininas y auxinas, además de factores intrínsecos como el genotipo, la edad y el tipo de explante empleado (Das *et al.*, 2018). Ya que existen estudios donde la aplicación de BA por sí solo no afectó la altura de brotes, su función fue más como un incentivador de la multiplicación celular, pero, por otra parte, cuando se combina con ANA se observa una marcada elongación de brotes (Mazariegos, 2011).

Los resultados para *T. valdezianus* en la altura de brotes son similares a los reportados por (Villavicencio *et al.*, 2022) en *T. viereckii subsp. major* donde la BA es la fitohormona que influye en esta variable superando en tamaño a los brotes obtenidos con KIN.



**Figura 15. Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para el Factor B composición del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *T. valdezianus*; (A) comparación en Numero de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al).**

#### 4.3.5 Efectos de la interacción de los Factores AxB

El análisis de la interacción mostró que el tratamiento T3= (2.5 + 0.25) :(KIN + AIB) produjo el valor medio significativamente más alto de Nb (8.36 mm  $\pm$  2.45), el cual fue estadísticamente superior al de los demás tratamientos T4= (5.0 + 0.50) :(KIN + AIB) (7.04) y T1= (2.5 + 0.25) :(BA + ANA) (6.67), los cuales se agruparon en la misma categoría homogénea (Grupo b). El tratamiento T2= (5.0 + 0.50) :(BA + ANA) (7.38) mostró un valor intermedio que no difirió significativamente del grupo de mejor desempeño ni de los grupos de menor desempeño (Grupo ab) (**Figura 16**). Este hallazgo crucial permite integrar y dar sentido a las conclusiones obtenidas en los análisis por separado, demostrando que la respuesta morfogénica está gobernada por un balance hormonal preciso que depende críticamente de la afinidad molecular entre el regulador y su concentración (George *et al.*, 2008) (**Figura 17**).

La superioridad del T3 explica la aparente contradicción entre los efectos principales. Por un lado, se había establecido que KIN+AIB era superior a BA+ANA (Factor B), y por otro, que no existían diferencias significativas entre

concentraciones (Factor A). La interacción demuestra que esta falta de diferencia general fue el resultado de combinar efectos opuestos: mientras que para KIN+AIB, la concentración baja (T3) fue claramente superior a la concentración alta (T4), para BA+ANA, la concentración alta (T2) tendió a ser mejor que la baja (T1). Estos efectos antagónicos se enmascaran en el análisis del factor A solo, pero la interacción los desvela, destacando la especificidad de la respuesta, un fenómeno también observado en *Myrciaria dubia* (Avalos, 2010).

Desde una perspectiva fisiológica, el éxito del T3 puede atribuirse a la creación de un ambiente hormonal balanceado y de baja intensidad que resulta ideal para *T. valdezianus*. La combinación de KIN, una citoquinina de actividad moderada y con mejor compatibilidad fisiológica para esta especie (Bozsó y Barna, 2021), con AIB, una auxina estable y de baja fitotoxicidad (Mesén, 1998; Gehlot y Arya, 2014), a una concentración que satura los receptores sin inducir estrés ( $2.5 + 0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), parece prolongar la fase meristemática activa de manera óptima (Moubayidin *et al.*, 2009).

Este ambiente favorece la división celular sin forzar una diferenciación prematura ni desencadenar los mecanismos de fitotoxicidad que sí se observan con concentraciones más altas (Arias-Zabala *et al.*, 2009). Esto concuerda con lo reportado por Palacios *et al.* (2015) en la misma especie, donde la brotación máxima se logró con KIN en ausencia de auxina, sugiriendo que la adición de AIB en la dosis baja del T3 pudo modular sutilmente la actividad de la KIN potenciando su transporte según Seth *et al.* (1966) sin ejercer el efecto antagónico que desplaza la señalización hacia la callogénesis (Skoog y Miller, 1957).

Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados en otras cactáceas, donde la combinación de Kinetina con una auxina favoreció el desarrollo de brotes. Por ejemplo, Orozco-Sifuentes *et al.* (2014) en *Epithelantha micromeris* encontraron que la interacción de KIN+AIA a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  producía una media de 8.0 brotes por explante. De manera similar, Villavicencio *et al.* (2012) en la misma especie reportaron que concentraciones de KIN y AIB en una relación 10:1 generaban la

mayor tasa de multiplicación, lo que sugiere que esta interacción es factible para la inducción de brotes en cactáceas, hallazgo también observado en *Strombocactus disciformis* y *Turbinicarpus pseudomacrochele* (Soltero y Portillo, 2015). No obstante, es crucial destacar que los efectos de las fitohormonas dependen críticamente de la especie y el tipo de tejido (George *et al.*, 2008), lo que subraya la importancia de la optimización específica para *T. valdezianus* lograda en este trabajo.

Por el contrario, el rendimiento inferior del T1 (BA+ANA a baja concentración) confirma la menor afinidad intrínseca de esta combinación más potente y agresiva para la brotación en *T. valdezianus* (Garcia-Osuna *et al.*, 2011). Mientras que el desempeño intermedio del T2 (BA+ANA a alta concentración) sugiere un efecto de "fuerza bruta" hormonal, donde la alta potencia del BA y el ANA estimula cierta proliferación, pero que es contrarrestada por los efectos inhibitorios del exceso hormonal y su posible fitotoxicidad (Arias-Zabala *et al.*, 2009; Taiz *et al.*, 2021), resultando en una respuesta subóptima. Finalmente, la caída en el rendimiento del T4 (KIN+AIB a alta concentración) confirma el principio de fitotoxicidad, donde incluso la combinación más adecuada se vuelve inhibitoria cuando se excede su concentración óptima, un fenómeno ampliamente documentado en otras especies como *Syringa koreensis* y *saccharum officinarum* (Rahman *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2025).

La identificación de esta interacción permite establecer una recomendación de protocolo sólida y basada en evidencia. El tratamiento T3 (KIN + AIB a 2.5 + 0.25 mg·L<sup>-1</sup>) se establece inequívocamente como el régimen óptimo para la fase de multiplicación de *T. valdezianus*, ya que maximiza el número de brotes aprovechando la sinergia específica entre un tipo de regulador adecuado y una concentración eficiente. Esto no solo asegura la máxima productividad, sino que también se alinea con la generación de brotes de mayor calidad fisiológica, al operar dentro de los umbrales de estrés hormonal de la planta.



Las medias de altura de brotes oscilaron entre  $5.50 \pm 0.13$  mm y  $6.38 \pm 0.16$  mm, observándose que los tratamientos con menor concentración de citocinina ( $2.5 + 0.25$  mg·L<sup>-1</sup>) tendieron a presentar alturas ligeramente mayores que los tratamientos con mayor concentración ( $5.0 + 0.50$  mg·L<sup>-1</sup>), independientemente del tipo de fitoregulador aplicado. De manera similar, aunque no significativa, los tratamientos con la combinación de auxinas BA + ANA mostraron la mayor altura promedio ( $6.38 \pm 0.16$  mm), mientras que los tratamientos con KIN + AIB presentaron valores algo menores (5.50–6.09 mm).

Sin embargo, según el análisis post hoc basado en el modelo no paramétrico ART, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, sin que ninguna combinación destacara significativamente sobre las demás. Esto indica que, a diferencia de lo observado para la proliferación de brotes, la respuesta en elongación al tipo de fitoregulador y la concentración fue consistente y dependió principalmente de los efectos principales.

La ausencia de interacción significativa sugiere que los mecanismos que regulan la elongación celular en *T. valdezianus* responden a las señales hormonales de manera más directa y menos susceptible a interacciones complejas. Una explicación plausible es que las concentraciones utilizadas estuvieron dentro de un rango "saturado" donde las células ya alcanzaron su máximo nivel de respuesta hormonal, haciendo que los efectos aditivos o antagónicos no fueran detectables (George *et al.*, 2008). Este fenómeno podría estar relacionado con características específicas de las cactáceas, como cutículas gruesas, tasas lentas de división celular o reservas hormonales endógenas que modulan la sensibilidad a los reguladores exógenos (Avalos, 2010; Davies, 2010).

Este patrón concuerda con reportes previos en cactáceas. En *Ariocarpus kotschoubeyanus*, Moebius-Goldammer *et al.* (2003) observaron respuestas morfogénicas independientes de la concentración de fitoreguladores. Asimismo, en *Mammillaria elongata*, Papafotiou *et al.* (2001) encontraron que concentraciones muy bajas de ANA ( $0.1$  mg·L<sup>-1</sup>) o incluso la ausencia de reguladores promovieron

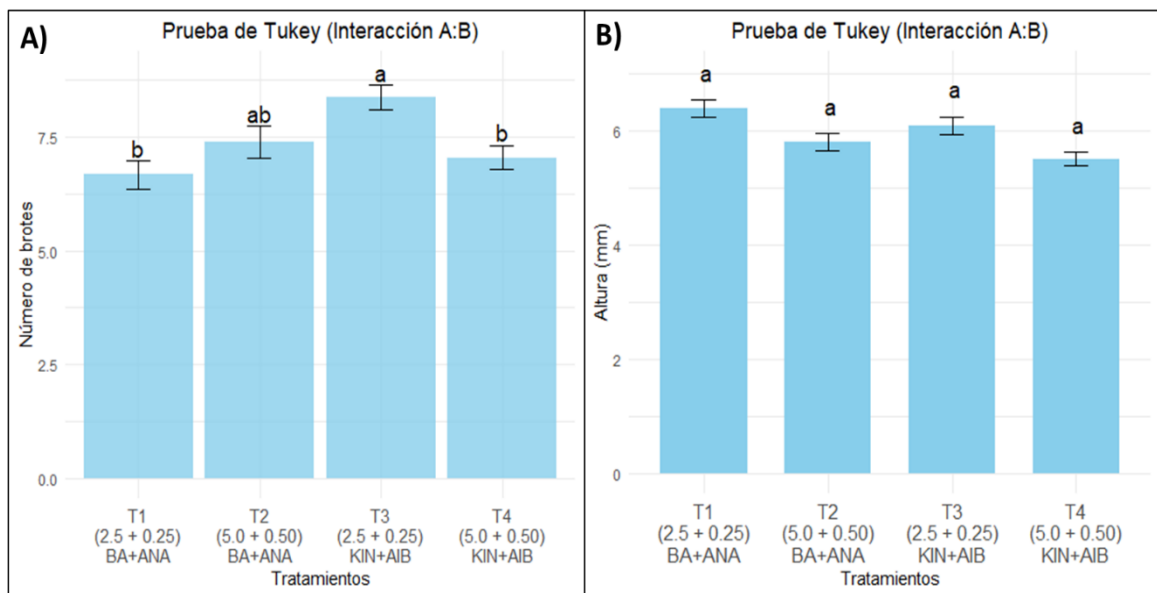
respuestas organogénicas superiores. De forma consistente, Estrada-Luna, (2002) y Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2015) reportaron que en varias especies de cactáceas la elongación de brotes responde principalmente a efectos principales de la concentración más que a interacciones complejas.

Desde la perspectiva aplicada, la falta de interacción simplifica la optimización del protocolo para la elongación, ya que permite priorizar sistemáticamente el uso de bajas concentraciones ( $2.5 + 0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para maximizar la altura de los brotes. Esto coincide con lo descrito en *Mammillaria spp.* donde la combinación de KIN con AIA favoreció un desarrollo equilibrado entre elongación y proliferación (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007). Así, la selección del tipo de regulador puede enfocarse en los objetivos del protocolo: BA+ANA para obtener la mayor elongación posible, o KIN+AIB para promover un crecimiento más integral. Además, el uso de dosis bajas reduce el riesgo de variación somaclonal y fitotoxicidad, problemas documentados al emplear concentraciones elevadas de fitoreguladores en cactáceas y otras especies (Sánchez-Olate *et al.*, 2004).

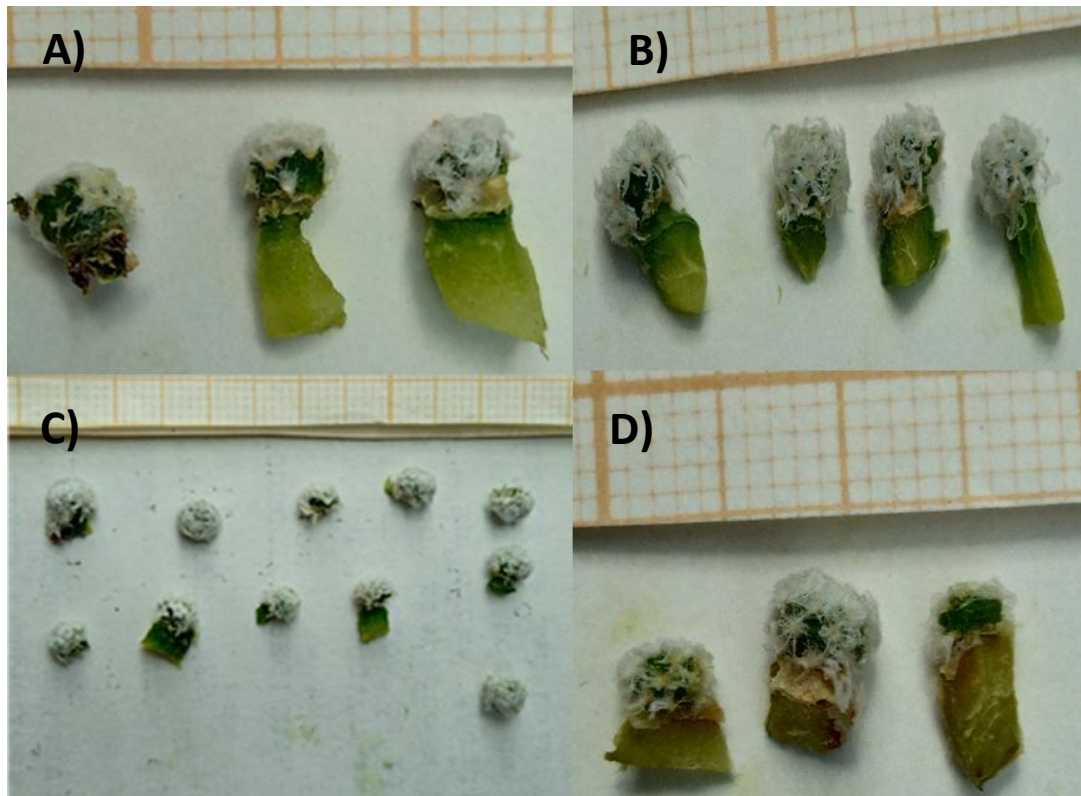
En consecuencia, se concluye que los mecanismos regulatorios de la elongación en *T. valdezianus* operan de manera distinta a los de la proliferación de brotes. Mientras que la proliferación responde principalmente a interacciones específicas entre tipo y concentración de reguladores, como ha sido documentado en cactáceas donde la combinación y el balance auxina/citoquinina determinan la inducción de yemas (Skoog y Miller, 1957; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007), la elongación muestra una dependencia más directa de los efectos principales, particularmente de la concentración dentro del rango evaluado. Este patrón ha sido observado tanto en cactáceas (Papafotiou *et al.*, 2001; Civatti *et al.*, 2017) como en especies leñosas, donde altas dosis de fitoreguladores tienden a reducir la elongación y generan brotes compactos (Sánchez-Olate *et al.*, 2004).

Los resultados del análisis de la interacción entre tipo y concentración de fitoreguladores indican que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que plantea que al menos un tratamiento tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta, se cumple

para la proliferación de brotes (Nb), dado que el tratamiento T3 (KIN + AIB a 2.5 + 0.25 mg·L<sup>-1</sup>) produjo un número de brotes significativamente mayor que los demás tratamientos. Por otro lado, para la elongación de brotes (Al), no se evidencia cumplimiento de H<sub>1</sub> en cuanto a la interacción, ya que no se detectaron diferencias significativas entre combinaciones, y la respuesta depende principalmente de los efectos principales de los factores la combinación de factores no potencia adicionalmente la respuesta, por lo tanto, el efecto es aditivo. Esto sugiere que la proliferación de brotes es más sensible a la interacción entre tipo y concentración de fitoreguladores, mientras que la elongación se regula de manera más directa por la presencia y concentración de cada regulador por separado



**Figura 16. Resultados de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para la interacción AxB en la multiplicación *in vitro* de *T. valdezianus*; (A) comparación en Número de brotes (Nb); (B) Altura de brotes (Al).**



**Figura 17. Efecto de los tratamientos T1=(A), T2=(B), T3=(C) T4=(D) en la multiplicacion *in vitro* de *T. valdezianus*.**

## V. CONCLUSIONES

Este estudio permite establecer un protocolo secuencial y optimizado para la micropropagación de *T. valdezianus*:

- Germinación: Puede realizarse eficientemente en un medio simple (agar-sacarosa), aprovechando la alta viabilidad natural de las semillas.
- Crecimiento post-germinación: Debe utilizarse medio MS al 50% suplementado con AG<sub>3</sub> (T4) para maximizar el desarrollo de plántulas.
- Multiplicación: La combinación KIN + AIB a 2.5 + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> (T3) es la opción óptima para maximizar el número de brotes.
- Elongación: Debe priorizarse el uso de bajas concentraciones de reguladores (2.5 + 0.25 mg·L<sup>-1</sup>) para obtener brotes bien desarrollados.

En conclusión, la micropropagación exitosa de *T. valdezianus* depende del reconocimiento de la especificidad de cada fase del desarrollo y de la optimización independiente de los factores críticos para cada una de ellas. Los protocolos estandarizados resultantes de esta investigación representan una herramienta valiosa para la conservación y propagación masiva de esta especie cactácea amenazada.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., & Dobránszki, J. (2022). An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Alcantara-Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.22490/24629448.3639>
- Álvarez, A. (2012). La biotecnología vegetal: ¿Una alternativa para el enfrentamiento a los impactos del cambio climático en Cuba? *Biotecnología vegetal*, 12(4), 195-201.
- Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, (35), 109-131.
- Anderson, E. F. (2001). *The Cactus Family*.
- Anicua, F. J., & Rivas, B. R. V. (2000). Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*) (Doctoral dissertation, Tesis de licenciatura. Biólogo Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México).

- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., & Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in plant science*, 15(4), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.003>
- Arias Zabala, M., Angarita Velásquez, M. J., Aguirre Cardona, A. M., Restrepo Flórez, J. M., & Montoya Vallejo, C. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4881-4895.
- Artur, M. A. S., Zhao, T., Ligterink, W., Schranz, E., & Hilhorst, H. W. (2019). Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants. *Genome biology and evolution*, 11(2), 459-471. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy248>
- Arteca, R. N., & Dong, C. N. (1981). Increased photosynthetic rates following gibberellic acid treatments to the roots of tomato plants. *Photosynthesis research*, 2(4), 243–249. <https://doi.org/10.1007/BF00056261>
- Askari, N., & Ghahremani, R. (2023). The role of phosphorus, potassium and calcium on *in vitro* culture of lily bulblet. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(1), 27-42.
- Avalos Tello, M. A. (2010). Niveles de concentraciones de fitorreguladores BAP y AIB y su efecto en la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales en *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh, camu camu.
- Band, L. R. (2021). Auxin fluxes through plasmodesmata. *New Phytologist*, 231(5), 1686-1692. <https://doi.org/10.1111/nph.17517>
- Ballesteros-Barrera, C., Aguilar-Romero, O., Zárate-Hernández, R., & Ballesteros-Tapia, L. (2017). Distribución geográfica y conservación de nueve especies

- del género *Ferocactus* (Cactaceae) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 131-140. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.2.131-140>
- Barlow, W. E., & Prentice, R. L. (1988). Residuals for relative risk regression. *Biometrika*, 75(1), 65-74. <https://doi.org/10.1093/biomet/75.1.65>
- Bansal, S., Sharma, M. K., Joshi, P., Malhotra, E. V., Latha, M., & Malik, S. K. (2024). An efficient direct organogenesis protocol for *in vitro* clonal propagation of *Rubia cordifolia* L. *Industrial Crops and Products*, 208, 117856.
- Beltrán-Peña, E. M., López-García, M., & López-Bucio, J. (2016). Regulación molecular de la germinación en angiospermas. *Ciencia Nicolaita*, (67), 37–54. <https://doi.org/10.35830/cn.vi67.223>
- Bevan, L., Jones, M., & Zheng, Y. (2021). Optimisation of nitrogen, phosphorus, and potassium for soilless production of *Cannabis sativa* in the flowering stage using response surface analysis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 764103. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.764103>
- Blasiak, J., Kuang, A., Farhangi, C. S., & Musgrave, M. E. (2006). Roles of intra-fruit oxygen and carbon dioxide in controlling pepper (*Capsicum annuum* L.) seed development and storage reserve deposition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1), 164-173. <https://doi.org/10.21273/JASHS.131.1.164>
- Bloom, A. J., Meyerhoff, P. A., Taylor, A. R., & Rost, T. L. (2002). Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 416-431.
- Bobich, E. G., & North, G. B. (2009). Structural implications of succulence: architecture, anatomy, and mechanics of photosynthetic stem succulents,



- pachycauls, and leaf succulents. In *Perspectives in biophysical plant ecophysiology: A tribute to Park S. Nobel*, 3-37.
- Boeri, P. (2017). *Bioprospección química y propagación de plantas nativas del monte patagónico como estrategias de conservación y uso sustentable* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/61034>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text* (Vol. 318). India: Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bozsó, Z., & Barna, B. (2021). Diverse effect of two cytokinins, kinetin and benzyladenine, on plant development, biotic stress tolerance, and gene expression. *Life*, 11(12), 1404.
- Buitink, J., & Leprince, O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology*, 48(3), 215-228. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.011>
- Buitink, J., & Leprince, O. (2008). Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes rendus biologiques*, 331(10), 788-795. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.08.002>
- Bridgen, M. P., Van Houtven, W., & Eeckhaut, T. (2018). Plant tissue culture techniques for breeding. In J. Van Huylenbroeck (Ed.), *Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding* (Vol. 11, pp. 127–144). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_6)
- Brummer, B., Potrykus, I., & Parish, R. W. (1984). The roles of cell-wall acidification and proton-pump stimulation in auxin-induced growth: studies using monensin. *Planta*, 162, 345-352. <https://doi.org/10.1007/BF00396747>

- Berleth, T., Scarpella, E., & Prusinkiewicz, P. (2007). Towards the systems biology of auxin-transport-mediated patterning. *Trends in Plant Science*, 12(4), 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.005>
- Bewley, J. D., Black, M., Bewley, J. D., & Black, M. (1994). *Seeds: germination, structure, and composition* (pp. 1-33). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8_1)
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Germination. In *Seeds*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4_4)
- Bravo-Hollis, H. E. L. I. A. (1991). *Las Cactáceas de México*. Universidad Autónoma de México. Primera Edición, Volumen I, II y III. México DF.
- Bobich, E. G., & North, G. B. (2009). Structural implications of succulence: architecture, anatomy, and mechanics of photosynthetic stem succulents, pachycauls, and leaf succulents. *Perspectives in biophysical plant ecophysiology: A tribute to Park S. Nobel*, 3-37.
- Bouzroud, S., El Maaiden, E., Sobeh, M., Devkota, K. P., Boukcim, H., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2022). Micropropagation of *Opuntia* and other cacti species through axillary shoot proliferation: a comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 926653. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926653>
- Buyukdemirci, H. (2005). The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks *in vitro*. In *V International Cherry Symposium*, 795 (pp. 419-422).

- Cakmak, I., & Kirkby, E. A. (2008). Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 692-704. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01042.x>
- Cantú, J. C., & Sánchez, M. E. (2024). Illegal Wildlife Trade in Mexico from 2014-2023. Teyeliz AC.
- Capaldi, F. R., Gratão, P. L., Reis, A. R., Lima, L. W., & Azevedo, R. A. (2015). Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. *Tropical Plant Biology*, 8, 60-73. <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9152-1>
- Carnelos, D., Lozano, J., Giardina, E., Tognetti, J., & di Benedetto, H. (2022). Reanálisis de la acción de la citoquinina: los cambios anatómicos de la hoja juegan un papel clave en la promoción del crecimiento impulsada por la 6-bencilaminopurina en lechuga cultivada en maceta. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 28(2), 109-133. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2021.07.015>
- Chandimali, N., Park, E. H., Bak, S. G., Lim, H. J., Won, Y. S., & Lee, S. J. (2024). Seaweed callus culture: a comprehensive review of current circumstances and future perspectives. *Algal Research*, 77, 103376. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103376>
- Chaves, V. T. A., Amorim dos Santos, E. P., & da Cunha Rodrigues, A. C. (2021). Meio MS em diferentes concentrações no desenvolvimento inicial *in vitro* de *Melocactus conoideus* Buining & Brederoo. *Scientia: Revista Científica Multidisciplinar*, 6(2), 81–91.
- Chen, Z., Wang, L., Cardoso, J. A., Zhu, S., Liu, G., Rao, I. M., & Lin, Y. (2023). Improving phosphorus acquisition efficiency through modification of root growth responses to phosphate starvation in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1094157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1094157>

- Chimdessa, E. (2020). Composition and preparation of plant tissue culture medium. J. Tissue Cult. Bioeng, 3, 281-286. <https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>
- Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J. C., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Limonium var. Misty blue. Agronomía Colombiana, 25(1), 47-53.
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Schnadelbach, A. S., & Bellintani, M. C. (2017). *In vitro* multiplication and genetic stability of two species of Micranthocereus Backeb. (Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 131(3), 537-545. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1304-6>
- CRUZ REYES, J. D. L. (2015). Distribucion, asociacion y evaluacion del estado de salud del (*Turbinicarpus valdezianus* Glass & RA Foster), en tres municipios del estado de Coahuila, México.
- CITES. (1973). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Recuperado de <https://cites.org>
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). (n.d.). Appendices I, II and III. CITES. Recuperado el 4 de marzo de 2025, de <https://cites.org/eng/app/appendices.php>
- Cowan, J. A. (2002). Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 15(3), 225–235. <https://doi.org/10.1023/a:1016022730880>

- Cox, D. R. (1972). The Cox Proportional Hazards model. *Journal of the Royal Statistical Society*, 34.
- Das, J., Bora, S., Das, M., & Pathak, P. (2018). A review on *in vitro* culture of Aloe vera, type of explants and impact of growing media and growth regulators. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(6), 3473-3489.
- Davies, P. J. (2010). Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. In *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* (pp. 16-35). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Dávila-Figueroa, C. A., Lourdes de la Rosa-Carrillo, M. D., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of Turbinicarpus (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 540-545. <https://doi.org/10.1079/IVP2005668>
- De la Rosa-Carrillo, M. D. (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género Turbinicarpus. *Interciencia*, 37(2), 114-120.
- Di Sacco, A., Way, M., León, L., Suárez, C. I., & Díaz, J. V. (2020). Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres. Royal Botanic Gardens e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Kew, RT, England. 79 p.
- Doctrinal, M., Sangwan, R. S., & Sangwan-Norreel, B. S. (1989). *In vitro* gynogenesis in Beta vulgaris L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17, 1-12.
- Dorenstouter, H., Pieters, G. A., & Findenegg, G. R. (1985). Distribution of magnesium between chlorophyll and other photosynthetic functions in

- magnesium deficient “sun”; and “shade”; leaves of poplar. *Journal of Plant Nutrition*, 8(12), 1089-1101. <https://doi.org/10.1080/01904168509363409>
- Dresch, D. M., Silvana, P. Q. S., & Masetto, T. E. (2014). Effect of storage in overcoming seed dormancy of *Annona coriacea* Mart. seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(4), 2077-2085.
- Dunlap, J. R., Kresovich, S., & McGee, R. E. (1986). The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiology*, 81(3), 934-936. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.934>
- El Finti, A., El Boullani, R., Naima, A. I. T., Msanda, F., Serghini, M. A., & El Mousadik, A. (2013). *In vitro* propagation of three Moroccan prickly pear cactus *Opuntia* and plant establishment in soil. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(1), 39-44.
- Estrada-Luna, A. A., López-Peralta, C., & Cárdenas-Soriano, E. (2002). *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp.*). *Scientia Horticulturae*, 92(3-4), 317-327. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00296-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00296-5)
- Esteves, P. F., Sato, A., & Esquibel, M. A. (2010). 6-Benziladenine (BA) and giberelic acid (GA<sub>3</sub>) effects on *in vitro* development of *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose (Cactaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 6(2), 77-81.
- Fan, X., Zhou, X., Chen, H., Tang, M., & Xie, X. (2021). Cross-talks between macro- and micronutrient uptake and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 663477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.663477>

- Farhat, N., Elkhouni, A., Zorrig, W., et al. (2016). Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 145. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2165-z>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fenner, M., & Thompson, K. (2005). *The ecology of seeds*. Cambridge University Press.
- Fitz Maurice, W. A., & Fitz Maurice, B. (2017). *Turbinicarpus valdezianus* (amended version of 2013 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T41000A121558667. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T41000A121558667.en>
- Flores, J., Jurado, E., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology*, 23(1), 43-46.
- Flores, A., & Zárate, H. (2001). *Guía de Cactáceas de Coahuila*. Instituto Coahuilense de Ecología, 197 pp.
- Folta, K. M., & Carvalho, S. D. (2015). Photoreceptors and control of horticultural plant traits. *HortScience*, 50(9), 1274-1280. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1274>
- Fu, X., & Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421(6924), 740-743.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression* (3rd ed.). SAGE Publications.

- Gago, J., Martínez-Núñez, L., Landin, M., Flexas, J., & Gallego, P. P. (2014). Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. PLoS One, 9(1), e85989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085989>
- Galafassi-Idan, N., Tarkowski, P., Turečková, V., & Wolf, S. (2020). Root–shoot communication in tomato plants: cytokinin as a signal molecule modulating leaf photosynthetic activity. Journal of Experimental Botany, 71(1), 247-257. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz399>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50(1), 151-158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- García Osuna, H. T., Benavides Mendoza, A., Escobedo Bocardo, L., Villarreal Quintanilla, J. A., & Cornejo Oviedo, E. (2011). Hyperhydricity control of *in vitro* shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) GL & F. Phytón-Revista Internacional de Botánica Experimental, 175. <https://doi.org/10.32604/phyton.2011.80.175>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture (3rd ed., pp. 65-175). The Netherlands: Springer.
- Gehlot, A., Gupta, R. K., Tripathi, A., Arya, I. D., & Arya, S. (2014). Vegetative propagation of *Azadirachta indica*: effect of auxin and rooting media on adventitious root induction in mini-cuttings. Advances in Forestry Science, 1(1), 1-9.
- Geilfus, C. M. (2017). The pH of the apoplast: dynamic factor with functional impact under stress. Molecular Plant, 10(11), 1371-1386.



- Gilman, I. S., & Edwards, E. J. (2020). Crassulacean acid metabolism. *Current Biology*, 30(2), R57-R62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.073>
- Gomes, F. L. A. F., Heredia, F. F., e Silva, P. B., Facó, O., & de Paiva Campos, F. D. A. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, 108(1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.007>
- Goldstein, G., & Nobel, P. S. (1994). Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. *Plant Physiology*, 104(2), 675-681. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.675>
- Gomez, E. M. (2020). Semillas de cáctaceas: factores internos y externos que influyen en su germinación. <http://hdl.handle.net/11627/5431>
- Guerrero, P. C., Majure, L. C., Cornejo-Romero, A., & Hernández-Hernández, T. (2019). Phylogenetic relationships and evolutionary trends in the cactus family. *Journal of Heredity*, 110(1), 4-21. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy064>
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., & Su, Z. H. (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Guzmán, U., Arias, S., & Dávila, P. (2003). Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM-Instituto de Biología.
- Ghashghaie, J., Brenckmann, F., & Saugier, B. (1991). Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 82(1), 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02904.x>

- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., & Tucci, M. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95(4), 319-332. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00031-6)
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9). <https://doi.org/10.4161/psb.25504>
- Hameg, R., Arteta, T. A., Landin, M., Gallego, P. P., & Barreal, M. E. (2020). Modeling and optimizing culture medium mineral composition for *in vitro* propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 554905. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905>
- Hart, D. S., Keightley, A., Sappington, D., Nguyen, P. T., Chritton, C., Seckinger, G. R., & Torres, K. C. (2016). Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solution. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(1), 1-9.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Nahar, K., Hossain, M. S., Mahmud, J. A., Hossen, M. S., Masud, A. A. C., Moumita, & Fujita, M. (2018). Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, 8(3), 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>
- Hernández-Oria, J. G., Chávez-Martínez, R. J., & Sánchez-Martínez, E. (2007). Factores de riesgo en las Cactaceae amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto Chihuahuense, México. *Interciencia*, 32(11), 728-734.

- Hisamatsu, T., King, R. W., Helliwell, C. A., & Koshioka, M. (2005). The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome-regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138(2), 1106-1116.
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husíčková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms19124045>
- Holden, M. H., & McDonald-Madden, E. (2017). High prices for rare species can drive large populations extinct: the anthropogenic Allee effect revisited. *Journal of Theoretical Biology*, 429, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.019>
- Huamaní-Sulca, R. E., De La Cruz-Arango, J., Chuchón-Martínez, S., & Pelaez-Pelaez, F. (2020). Comunidades endémicas de Cactáceas en peligro de extinción. Una necesidad de conservación de los recursos naturales del distrito de Pacaycasa. Ayacucho-Perú. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 92-109.
- Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 105-119. <https://doi.org/10.1007/BF01983223>
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., ... & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848-857. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00232>
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymer, B., et al. (2019). Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual Review of Plant*

- Biology, 70, 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
- Inoue, S. I., Hayashi, M., Huang, S., Yokosho, K., Gotoh, E., Ikematsu, S., ... & Ma, J. F. (2022). A tonoplast-localized magnesium transporter is crucial for stomatal opening in Arabidopsis under high  $Mg^{2+}$  conditions. *New Phytologist*, 236(3), 864-877. <https://doi.org/10.1111/nph.18410>
- International Seed Testing Association (ISTA). (2021). Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2021 Edition. ISTA, Bassersdorf, ZH, Switzerland. 39 p.  
<https://www.seedtest.org/api/rm/224ZQ538DVP45P7/ogm20-05-rules-proposals-for-ista-2021.pdf>
- Ishfaq, M., Wang, Y., Yan, M., Wang, Z., Wu, L., Li, C., & Li, X. (2022). Physiological essence of magnesium in plants and its widespread deficiency in the farming system of China. *Frontiers in Plant Science*, 13, 802274. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.802274>
- Jana, S., Sivanesan, I., & Jeong, B. R. (2013). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(7), 549-553.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kirkham, M. B., & Holder, P. L. (1981). Water, osmotic, and turgor potentials of kinetin-treated callus. *Physiologia Plantarum*, 51(3), 349–354. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb05101.x>

- Kopriva, S., Malagoli, M., & Takahashi, H. (2019). Sulfur nutrition: Impacts on plant development, metabolism, and stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4069–4073. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz319>
- Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). *In vitro* plant propagation: A review. *Journal of Forest and Environmental Science*, 27(2), 61–72. <https://doi.org/10.7747/JFS.2011.27.2.1>
- Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2022). Auxin/cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1933. <https://doi.org/10.3390/ijms23041933>
- Lee, H., Han, G. I., Cheon, K. S., & Cheong, E. J. (2025). *In vitro* conditions research of *Sophora koreensis* Nakai for shoot elongation. *Plants* (Basel, Switzerland), 14(11), 1692. <https://doi.org/10.3390/plants14111692>
- LeClere, S., Schmelz, E. A., & Chourey, P. S. (2010). Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels. *Plant Physiology*, 153(1), 306–318. <https://doi.org/10.1104/pp.109.146193>
- Leitzen, S., Vogel, M., Steffens, M., Zapf, T., Müller, C. E., & Brandl, M. (2021). Quantification of degradation products formed during heat sterilization of glucose solutions by LC-MS/MS: Impact of autoclaving temperature and duration on degradation. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1121. <https://doi.org/10.3390/ph14111121>
- Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2014). Micropropagation of cacti—a review. *Haseltonia*, 2014(19), 46–63. <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>
- Liao, H., Liu, S., Li, Y., Yang, Q., & Hu, Y. (2025). Physiology and transcriptome analysis of exogenous GA<sub>3</sub> effects on the seed germination of *Phyllostachys*

- edulis. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(9), 686.  
<https://doi.org/10.3390/cimb470900686>
- Liu, J., Lyu, M., Liu, C., Ni, W., Guan, Y., Xie, H., & Jiang, Y. (2025). Exogenous GA<sub>3</sub> alleviates low nitrogen stress by enhancing leaf nitrogen assimilation and limiting the transport of photosynthates to roots in apple plants. *Fruit Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43038-025-00123-4>
- Loneragan, J. F., Snowball, K., & Simmons, W. J. (1968). Response of plants to calcium concentration in solution culture. *Australian Journal of Agricultural Research*, 19(6), 845–857. <https://doi.org/10.1071/AR9680845>
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13, 926752. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>
- Lordon, R., & Geelen, D. (2020). Natural variation in plant pluripotency and regeneration. *Plants*, 9(10), 1261. <https://doi.org/10.3390/plants9101261>
- Loza-Cornejo, S., Aparicio-Fernández, X., Patakfalvi, R. J., & Rosas-Saito, G. H. (2017). Caracteres anatómicos y fitoquímicos del tallo y raíz de *Mammillaria uncinata* (Cactaceae). *Acta Botánica Mexicana*, (120), 21–38. <https://doi.org/10.21829/abm120.2017.1159>
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Ludwig-Müller, J. (2014). Auxin and the interaction between plants and microorganisms. In *Auxin and its role in plant development* (pp. 413–434). Vienna: Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1526-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1526-8_18)

- Lloyd, G., & McCown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, 30, 421–427.
- Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S., & Buitink, J. (2017). Late seed maturation: Drying without dying. *Journal of Experimental Botany*, 68(4), 827–841. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw363>
- Luo, J., Wang, X., Pang, W., & Jiang, J. (2024). GA<sub>3</sub>-induced SIXTH19 expression enhances cell wall remodeling and plant height in tomatoes. *Plants*, 13(24), 3578. <https://doi.org/10.3390/plants13243578>
- Magnani, M. F. C., & Cardoso, J. C. (2023). Light and ethephon overcoming seed dormancy in Friar's Crown (*Melocactus zehntneri*, Cactaceae), a Brazilian cactus. *Plants* (Basel, Switzerland), 12(24), 4127. <https://doi.org/10.3390/plants12244127>
- Manzo Rodriguez, S. M., González Rosas, H., Garcia de los Santos, G., Garcia-Moya, E., Espinosa-Hernández, V., Corona Torres, T., & Robledo-Paz, A. (2022). Viabilidad y germinación de semillas de cuatro especies amenazadas de cactáceas. *Caldasia*, 44(2), 209–220. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v44n2.86192>
- Martínez-Andújar, C., Pluskota, W. E., Bassel, G. W., Asahina, M., Pupel, P., Nguyen, T. T., ... & Nonogaki, H. (2012). Mechanisms of hormonal regulation of endosperm cap-specific gene expression in tomato seeds. *The Plant Journal*, 71(4), 575–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05042.x>
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, Ó. G., Castillo-Gutiérrez, A., & Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuita

- (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). Revista Fitotecnia Mexicana, 38(4), 369–374.
- Matilla, A. J. (2021). The orthodox dry seeds are alive: A clear example of desiccation tolerance. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(1), 20. <https://doi.org/10.3390/plants11010020>
- Mäkilä, R., Wybouw, B., Smetana, O., Vainio, L., Solé-Gil, A., Lyu, M., ... & Mähönen, A. P. (2023). Gibberellins promote polar auxin transport to regulate stem cell fate decisions in cambium. *Nature Plants*, 9(4), 631–644. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01354-3>
- Mascot Gomez, E. (2020). Semillas de cáctaceas: Factores internos y externos que influyen en su germinación. <http://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/2456>
- Mazariegos, C. A. (2011). Evaluación de tres concentraciones de auxinas (ANA) y cinco de citocinas (BAP) en la propagación *in vitro* del piñon (*Jatropha curcas* L.) [Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala].
- Mohamad, M. E., Awad, A. A., Majrashi, A., Abd Esadek, O. A., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., & Gendy, A. S. (2022). *In vitro* study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of Paulownia species (*Paulownia hybrid* and *Paulownia tomentosa*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1598–1603. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.018>
- Mohamed, T. A., Ali, S. K., Elshamy, A. I., Saleh, I. A., Ibrahim, M. A., Atia, M. A., ... & Hegazy, M. E. F. (2022). Plant cell cultures: An enzymatic tool for polyphenolic and flavonoid transformations. *Phytomedicine*, 100, 154019. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154019>



- Mondino, P. (2009). Preparación de medios de cultivo. Métodos en Fitopatología.
- Monostori, T., Tanács, L., & Mile, L. (2010). Studies on *in vitro* propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*. In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 937 (pp. 255–261).
- Morafka, D. J. (2012). A biogeographical analysis of the Chihuahuan Desert through its herpetofauna (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Mora-Cruz, Y., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., & Cruz-Huerta, N. (2023). Regeneración *in vitro* de plantas de *Prosthechea vitellina* (Lindley) WE Higging por organogénesis directa. Revista Fitotecnia Mexicana, 46(1), 33–40.
- MORALES, P., & BLANCA, M. (2014). Evaluación de auxinas en vitroplantas de (*Turbinicarpus valdezianus*). UAAAN, Buenavista Saltillo Coah., Mexico. <https://www.sidalc.net/search/Record/KOHA-OAI-UAAAN:62781>
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. Trends in Plant Science, 14(10), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.003>
- Mauseth, J. D. (2006). Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. Annals of Botany, 98(5), 901–926. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl133>
- Mesén, F. (1998). Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: Uso de propagadores de sub-irrigación. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza – CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Mendiburu, F. de. (2021). agricolae: Statistical procedures for agricultural research (R package version 1.3-5).

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murcia, G., Pontin, M., Reinoso, H., Baraldi, R., Bertazza, G., Gómez-Talquenca, S., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2016). ABA and GA<sub>3</sub> increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiologia Plantarum*, 156(3), 323–337. <https://doi.org/10.1111/ppl.12390>
- Narayan, O. P., Kumar, P., Yadav, B., Dua, M., & Johri, A. K. (2022). Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2030082>
- Negi, N. P., Prakash, G., Narwal, P., Panwar, R., Kumar, D., Chaudhry, B., & Rustagi, A. (2023). The calcium connection: Exploring the intricacies of calcium signaling in plant-microbe interactions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1248648. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1248648>
- Nissen, S. J., & Sutter, E. G. (1988, June). Stability of IAA and IBA in nutrient medium after autoclaving and after storage under various environmental-conditions. *HortScience*, 23(3), 758.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Nowak, K., Morończyk, J., Wójcik, A., & Gaj, M. D. (2020). AGL15 controls the embryogenic reprogramming of somatic cells in Arabidopsis through the histone acetylation-mediated repression of the miRNA biogenesis genes.

International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 6733.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186733>

Núñez, V. M. M., & del Moral, L. F. G. (2016). Manual de prácticas de biotecnología vegetal. Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.

Ochoa, M. J., González-Flores, L. M., Cruz-Rubio, J. M., Portillo, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2015). Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. Journal of the Professional Association for Cactus Development, 17, 50–60.

Ohira, K., Ikeda, M., & Ojima, K. (1976). Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture. Plant and Cell Physiology, 17(3), 583–590.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076281>

Ookawara, R., Satoh, S., Yoshioka, T., & Ishizawa, K. (2005). Expression of  $\alpha$ -expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes associated with shoot elongation enhanced by anoxia, ethylene and carbon dioxide in arrowhead (*Sagittaria pygmaea* Miq.) tubers. Annals of Botany, 96(4), 693–702. <https://doi.org/10.1093/aob/mci239>

Orozco, R., López, C., González, V., & Carballo, A. (2000). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedades Atlantic y 1625 Frito Lay, crecidas *in vitro*. Uniciencia, 17(1), 31–34.

Orozco-Sifuentes, M. M., Escobedo-Bocardo, L., Reyes-Valdés, H., Torres-Tapia, A., & María-Ochoa, A. (2014). Propagación *in vitro* de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt & Rose (Cactaceae), especie con protección especial. Agraria, 11(3), 91–96.

Ortega-Baes, P., & Rojas-Aréchiga, M. (2007). Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and gibberellic acid effects.

Journal of Arid Environments, 69(1), 169–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.10.019>

Palacios, A. M., Navarro, R. C., Hernández Ortega, D. B., & Ávila, V. C. (2016). Micropropagación de *Turbinicarpus valdezianus* (Möeller) Glass & Foster (Cactaceae) un cactus endémico en el norte de México. HortScience, 51(1), 94–97. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.1.94>

Papafotiou, M., Balotis, G. N., Louka, P. T., & Chronopoulos, J. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65, 163–167.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010601328667>

Pareek, A., & Kothari, S. L. (2003). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of Dianthus. Scientia Horticulturae, 98(4), 449–459. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00078-5)

Paton, J. E., & Scriven, F. M. (1989). Use of NAA to inhibit sprouting in sweet potatoes (*Ipomea batatas*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 48(4), 421–427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740480414>

Pasternak, T., Kircher, S., Palme, K., & Pérez-Pérez, J. M. (2023). Regulation of early seedling establishment and root development in *Arabidopsis thaliana* by light and carbohydrates. Planta, 258(4), 76. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04226-9>

Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. Plants, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>

- Peña, E. M. B., López-García, M. A. R. I. N. A., & López-Bucio, J. (2016). Regulación molecular de la germinación en angiospermas. *Ciencia Nicolaita*, (67), 37–54. <https://doi.org/10.35830/cn.vi67.223>
- Perveen, S., Varshney, A., Anis, M., & Aref, I. M. (2011). Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbeck*. *Journal of Forestry Research*, 22(1), 47–52. <https://doi.org/10.1007/s11676-011-0106-2>
- Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, M. D. S., Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, 72, 540–561. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>
- Pimienta, E., Hernandez, G., Domingues, A., & Nobel, P. S. (1998). Growth and development of the arborescent cactus *Stenocereus queretaroensis* in a subtropical semiarid environment, including effects of gibberellic acid. *Tree Physiology*, 18(1), 59–64. <https://doi.org/10.1093/treephys/18.1.59>
- Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., Ruffoni, B., & Mascarello, C. (2000). La propagazione dei *Limonium ornamentali* speciale *Limonium*. *Flortecnica*, 5, 101–110.
- Park, C. H., Choi, M., Park, Y. E., Yeo, H. J., Kim, J. K., Kim, Y. B., ... & Park, S. U. (2023). Influence of different types of carbon sources on glucosinolate and phenolic compounds in radish sprouts. *Horticulturae*, 9(6), 679. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060679>
- Park, S. (2021). Plant tissue culture: Techniques and experiments. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03169-X>
- Qamar, M., & Muneer, M. (2005). Comparative photocatalytic study of two selected pesticide derivatives, indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in

- aqueous suspensions of titanium dioxide. *Journal of hazardous materials*, 120(1-3), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.01.005>
- Qu, Y., Liu, X., Zhang, X., Tang, Y., Hu, Y., Chen, S., ... & Zhang, Q. (2019). Transcriptional regulation of Arabidopsis copper amine oxidase  $\zeta$  (CuAO $\zeta$ ) in indole-3-butyric acid-induced lateral root development. *Plant Growth Regulation*, 89(3), 287-297.
- Rahman, M. M., Ivy, N. A., Mian, M. A. K., Rasul, M. G., & Hossain, M. M. (2018). Effect of auxin and cytokinin for shoot regeneration from *in vitro* culture of sugarcane. *International Journal of Plant Biology Research*, 6(1), 1079.
- Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., Nuñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of Mammillaria (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 660–665. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9076-z>
- Ramírez-González, G., Martínez-Solís, J., & Colinas-León, M. T. (2019). Germinación y crecimiento *ex vitro* e *in vitro* de cinco especies de cactáceas del género Mammillaria. *Polibotánica*, (48), 99–110.
- Ramon, U., Weiss, D., & Illouz-Eliaz, N. (2021). Underground gibberellin activity. *The New Phytologist*, 229(3), 1196–1200. <https://doi.org/10.1111/nph.16930>
- Ranal, M. A., & Santana, D. G. D. (2006). How and why to measure the germination process? *Brazilian Journal of Botany*, 29, 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Novell, D., & Larinde, M. (2007). Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Bioversity International.

- Reed, B. M., Wada, S., DeNoma, J., & Niedz, R. P. (2013). Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(3), 343–355. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9504-1>
- Reid, D. M., Clements, J. B., & Carr, D. J. (1968). Red light induction of gibberellin synthesis in leaves. *Nature*, 217(5128), 580–582. <https://doi.org/10.1038/217580a0>
- Ribas, D. M., Araujo, W. L., Fernie, A. R., Schippers, J. H., & Mueller-Roeber, B. (2012). Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2769–2786. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers019>
- Rinaldi, L. M., Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., Ullah, I., & Leva, A. (2012). Recent advances in plant *in vitro* culture. Chapter 1, 1–28. <http://dx.doi.org/10.5772/52760>
- Rivas, M. Á., Frierio, I., Alarcón, M. V., & Salguero, J. (2022). Auxin-cytokinin balance shapes maize root architecture by controlling primary root elongation and lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 836592. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836592>
- Roberts, E. H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1(3), 499–514. <https://doi.org/10.15258/sst.1973.01.3.08>
- Rojas-Aréchiga, M., Mandujano, M. C., & Golubov, J. K. (2013). Seed size and photoblastism in species belonging to tribe Cacteae (Cactaceae). *Journal of Plant Research*, 126(3), 373–386. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0526-2>
- Ruan, Y. L., Jin, Y., Yang, Y. J., Li, G. J., & Boyer, J. S. (2010). Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield

- potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3(6), 942–955. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq037>
- Russo, V. M., Bruton, B. D., & Sams, C. E. (2010). Classification of temperature response in germination of Brassicas. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.08.007>
- Radi, H., Bouchiha, F., El Maataoui, S., Oubassou, E. Z., Rham, I., Alfeddy, M. N., & Mazri, M. A. (2023). Morphological and physio-biochemical responses of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) organogenic cultures to salt and drought stresses induced *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 154(2), 337–350. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02454-1>
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Saad, A. I., & Elshahed, A. M. (2012). Plant tissue culture media. Recent advances in plant *in vitro* culture, 30–40.
- Saadat, S., Majd, A., Naseri, L., Iranbakhsh, A., & Jafari, M. (2023). Optimization of somatic embryogenesis, synthetic seed production, and evaluation of genetic fidelity in *Teucrium polium* L. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 59(4), 483–496. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10360-6>
- Sage, R. F., Edwards, E. J., Heyduk, K., & Cushman, J. C. (2023). PREFACE Crassulacean acid metabolism (CAM) at the crossroads: A special issue in the *Annals of Botany* to honor 50 years of CAM research by Klaus Winter. *Annals of Botany*, mcad160. <https://doi.org/10.1093/aob/mcad160>
- Saibo, N. J., Vriezen, W. H., Beemster, G. T., & Van Der Straeten, D. (2003). Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by



- gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *The Plant Journal*, 33(6), 989–1000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01692.x>
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>
- Saldívar-Iglesias, P., Laguna-Cerda, A., Gutiérrez-Rodríguez, F., & Domínguez-Galindo, M. (2010). Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) JL Gentry. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 327–331. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/39251>
- Sanchez-Olate, M., Rios, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H., & Escobar, R. (2004). *In vitro* propagation of *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) from isolated embryos. *Bosque (Valdivia)*, 25(1), 123–128. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002004000100011>
- Sarma, M. K., Sharma, A. A., Samantara, K., & Wani, S. H. (2023). *In vitro* techniques in plant breeding. In A. Raina, M. R. Wani, R. A. Laskar, N. Tomlekova, & S. Khan (Eds.), *Advanced crop improvement* (Vol. 1, pp. 1–XX). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-28146-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-031-28146-4_8)
- Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocot and dicot plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Schneider, G., Lindqvist, Y., & Branden, C. I. (1992). RUBISCO: Structure and mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 21(1), 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.001003>

- Schoenfeld, D. (1982). Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika*, 69(1), 239–241. <https://doi.org/10.1093/biomet/69.1.239>
- Schwarz, O. J., & Beaty, R. M. (2018). Organogenesis. In *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises* (pp. 125–138). Routledge.
- Seth, A. K., Davies, C. R., & Wareing, P. F. (1966). Auxin effects on the mobility of kinetin in the plant. *Science*, 151(3710), 587–588. <https://doi.org/10.1126/science.151.3710.587>
- Sharma, C. P. (2006). *Plant micronutrients* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482280425>
- Shaul, O. (2002). Magnesium transport and function in plants: The tip of the iceberg. *Biometals*, 15(3), 309–323. <https://doi.org/10.1023/a:1016091118585>
- Shih, M. D., Hoekstra, F. A., & Hsing, Y. I. C. (2008). Late embryogenesis abundant proteins. In *Advances in botanical research* (Vol. 48, pp. 211–255). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00404-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00404-7)
- Shrivastav, P., Prasad, M., Singh, T. B., Yadav, A., Goyal, D., Ali, A., & Dantu, P. K. (2020). Role of nutrients in plant growth and development. In *Contaminants in agriculture: Sources, impacts and management* (pp. 43–59). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_2)
- Skirvin, R. M., Chu, M. C., Mann, M. L., Young, H., Sullivan, J., & Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5(4), 292–294. <https://doi.org/10.1007/BF00269825>
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium of the Society for Experimental Biology.

- Soriano, A. H. (2006). Propagación *in vitro* del Viejito (*Cephalocereus senilis*) (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional).
- Soria, C. D. (2006). Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana Ehrenberg subsp. Schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo (Doctoral dissertation, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zona Orizaba-Córdoba).
- Street, I. H., Mathews, D. E., Yamburkenko, M. V., Sorooshzadeh, A., John, R. T., Swarup, R., ... & Schaller, G. E. (2016). Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root. *Development*, 143(21), 3982–3993. <https://doi.org/10.1242/dev.138600>
- Sun, H., Cui, H., Zhang, J., Kang, J., Wang, Z., Li, M., Yi, F., Yang, Q., & Long, R. (2021). Gibberellins inhibit flavonoid biosynthesis and promote nitrogen metabolism in *Medicago truncatula*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9291. <https://doi.org/10.3390/ijms22179291>
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr004>
- Sierra, C. L. J. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. <https://ru.tic.unam.mx/handle/123456789/1844>
- Sawada, Y., Aoki, M., Nakaminami, K., Mitsunashi, W., Tatematsu, K., Kushiro, T., & Toyomasu, T. (2008). Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*, 146(3), 1386–1396. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113703>

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2022). Día Nacional de las Cactáceas 2022. Gobierno de México. Recuperado el 4 de marzo de 2025, de <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/dia-nacional-de-las-cactaceas-2022>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2021). Plant physiology and development.
- Tanimoto, E. (2012). Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin. *Annals of Botany*, 110(2), 373–381. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs089>
- Therneau, T. M., Grambsch, P. M., & Fleming, T. R. (1990). Martingale-based residuals for survival models. *Biometrika*, 77(1), 147–160. <https://doi.org/10.1093/biomet/77.1.147>
- Thor, K. (2019). Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in Plant Science*, 10, 440. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37, 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Torres, K. C. (2012). Tissue culture techniques for horticultural crops. Springer Science & Business Media.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1870-3>
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 99–114.

- Tunnacliffe, A., & Wise, M. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791–812. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., & Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693–698. <https://doi.org/10.1038/nature04028>
- Valle, R. M. (2021). Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de plátano (*Musa × paradisiaca* L.): Revisión de literatura. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7151>
- Valvekens, D., Van Montagu, M., & Van Lijsebettens, M. (1988). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 5536–5540. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5536>
- Venables, W. N., & Ripley, B. D. (2002). *Modern applied statistics with S* (4th ed.). Springer.
- Ventura, R. B., Otiniano, A. J., & Huamán, L. A. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150–164. <https://doi.org/10.36610/j.isab.2020.080200150>
- Vega, C. M. C., Pérez, J. C. S., Rodríguez, M. A., Sánchez, L. A., & Velázquez, S. F. (2008). Establecimiento de un sistema de micropropagación de *Peniosereus greggii* (Engelml.) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica*, 4(2).
- Verdier, J., Lalanne, D., Pelletier, S., Torres-Jerez, I., Righetti, K., Bandyopadhyay, K., & Buitink, J. (2013). A regulatory network-based approach dissects late

maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*, 163(2), 757–774.  
<https://doi.org/10.1104/pp.113.222380>

Vela-Gutiérrez, G., Zúñiga, E. J. L., Parra, E. G., García, E. L., Coronel, O. A. D. A., & López, A. A. V. (2019). Efecto de la luz roja y el contenido de nutrientes sobre la embriogénesis somática, enraizamiento y aclimatación a suelo de plantas de papaya maradol. *Biotecnia*, 21(1), 93–101.

Villavicencio, G. E. E., Arredondo, G. A., Carranza, P. M., Mares, A. O., Comparan, S. S., & González, C. A. (2010). Cactáceas ornamentales del Desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. *Campo Experimental Saltillo*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Saltillo, Coahuila, México. Libro técnico, (2), 345.

Villavicencio Gutiérrez, E. E., González Cortés, A., & Carranza Pérez, M. A. (2012). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) FAC Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental y recurso fitogenético del desierto chihuahuense. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 3(14), 83–102.

Villavicencio-Gutiérrez, E. E., Arellano-Ostoa, G., & Carranza-Pérez, M. A. (2022). Estabilidad del explante en la proliferación de brotes axilares *in vitro* de la biznaga. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(1), 53–64.  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v13i1.2309>

Villarreal-Quintanilla, J. A., Bartolomé-Hernández, J. A., Estrada-Castillón, E., Ramírez-Rodríguez, H., & Martínez-Amador, S. J. (2017). The endemic element of the Chihuahuan Desert vascular flora. *Acta Botánica Mexicana*, (118), 65–96. <https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1201>

- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P. K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 680–694.
- Wang, Y., Yao, Q., Zhang, Y., Zhang, Y., Xing, J., Yang, B., Mi, G., Li, Z., & Zhang, M. (2020). The role of gibberellins in regulation of nitrogen uptake and physiological traits in maize responding to nitrogen availability. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1824.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21051824>
- White, P. R. (1943). A handbook of plant tissue culture (Vol. 56, No. 2, p. 151). LWW.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., & Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.
- Woo, H. A., Ku, S. S., Jie, E. Y., Kim, H., Kim, H. S., Cho, H. S., ... & Kim, S. W. (2021). Efficient plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Euonymus alatus*. *Scientific Reports*, 11(1), 15120.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-94597-4>
- World Wildlife Fund (WWF). (n.d.). Comercio ilegal de vida silvestre. WWF. Recuperado el 4 de marzo de 2025, de <https://www.worldwildlife.org/descubre-wwf/historias/comercio-ilegal-de-vida-silvestre>
- Xu, Q., Krishnan, S., Merewitz, E., Xu, J., & Huang, B. (2016). Gibberellin-regulation and genetic variations in leaf elongation for tall fescue in association with differential gene expression controlling cell expansion. *Scientific Reports*, 6(1), 30258.

- Yamagami, R., Sieg, J. P., & Bevilacqua, P. C. (2021). Functional roles of chelated magnesium ions in RNA folding and function. *Biochemistry*, 60(31), 2374–2386. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00012>
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36–57. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>
- Yang, X. Y., & Pritchard, H. W. (2022). Los efectos estimulantes e inhibidores de la luz sobre la germinación de las semillas de *Cereus repandus* (Cactaceae) dependen en gran medida de la calidad espectral. *Investigación en Ciencia de Semillas*, 32(3), 166–174. <https://doi.org/10.1017/S0960258522000150>
- Zhai, N., & Xu, L. (2021). Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration. *Nature Plants*, 7(11), 1453–1460. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01015-8>
- Zhang, W., Cheng, X., Jing, Z., Cao, Y., Yuan, S., Zhang, H., & Zhang, Y. (2024). Exogenous GA<sub>3</sub> enhances nitrogen uptake and metabolism under low nitrate conditions in ‘Duli’ (*Pyrus betulifolia* Bunge) seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7967. <https://doi.org/10.3390/ijms25147967>
- Zhao, X. Y., Su, Y. H., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2008). Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 816–824. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00701.x>
- Zhu, X., Yang, M., Liu, R., Wang, Y., Zhang, B., Ye, Y., Li, P., Zhou, T., Liu, X., & Lian, X. (2025). GA-DELLA-OsMYB48-1 module-mediated regulation of inorganic phosphate uptake in rice. *The New Phytologist*, 248(2), 776–792. <https://doi.org/10.1111/nph.70430>