

## Micropropagación de *Calibanus hookeri* (lem.) trel (1911). Una especie amenazada

### Micropropagation of *Calibanus hookeri* (lem.) trel (1911). A threatened species

Cesar Núñez Coronado\*, Héctor González Rosas\*\*, Yolanda L. Fernández Pavía\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.80873

#### RESUMEN

La especie *Calibanus hookerii* perteneciente a la familia Asparagaceae, está registrada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 catalogada como planta amenazada. Sus poblaciones naturales se han visto reducidas de manera importante debido a una explotación excesiva y destrucción de su hábitat, por lo que se requiere de métodos de propagación eficaz que aseguren su conservación. La propagación *in vitro* es una alternativa viable para especies vegetales amenazadas. En la presente investigación se reporta el protocolo para la micropropagación de *Calibanus hookerii* mediante la germinación de semilla sin testa inoculada en medio MS complementado con 2.5, 5.0 y 7.0 mg L<sup>-1</sup> de 6 benciladenina (BA), cinetina (K), 2-isopentil-adenina (2iP) y tidiazuron (TDZ). Las variables a medir fueron porcentaje de germinación, número y longitud de brotes producidos por semilla.

El tratamiento más eficiente fue de 5.0 mg L<sup>-1</sup> de BA produciéndose un promedio de 26 brotes por semilla; el tratamiento menos eficaz fue con 2.5 mg L<sup>-1</sup> K en el cual solamente se obtuvieron dos brotes por semilla. De las tres concentraciones de 2iP solamente en la concentración de 7 mg L<sup>-1</sup> mostró resultados produciendo 6 brotes por semilla. En lo que respecta a la longitud del brote ningún tratamiento superó al testigo (8.07cm). La eficiencia la germinación *in vitro* fue de 56-97%.

**Palabras clave:** organogénesis directa, cultivo *in vitro*, citocininas, rescate.

#### ABSTRACT

The species *Calibanus hookerii* belonging to the family Asparagaceae is registered in the NOM-059-SEMARNAT-2010 cataloged in danger of extinction and therefore is necessary of propagation methods that assure its conservation and its propagation. *In vitro* propagation is a viable alternative for endangered plant species. The present investigation reports the protocol for the micropropagation of *Calibanus hookerii*. This was achieved by seed germination without test in MS medium supplemented with 2.5, 5.0 and 7.0 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzyladenine (BA), kinetin (K), 2-isopentyl-adenine (2iP) and tidiazuron (TDZ). The variables to be measured were percentage of germination, number and length of shoots produced by seed. The most efficient treatment was 5 mg L<sup>-1</sup> of BA producing an average of 26 shoots per seed, the worst treatment was with 2.5 K only produced 2 shoots per seed, of the four cytokin-

\* Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco Estado de México. <http://0000-0003-3221-8664>. [oth1cesar@hotmail.com](mailto:oth1cesar@hotmail.com).

\*\* Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco Estado de México. <http://orcid.org/0000-0002-2662-7616>. México. [hectorgr@colpos.mx](mailto:hectorgr@colpos.mx).

\*\*\* Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco Estado de México. <http://orcid.org/0000-0001-9922-3463>. México. [mapale1@colpos.mx](mailto:mapale1@colpos.mx). Autor para correspondencia.

ins used 2ip treatment in only one study of the Performed showed results (7 mg L<sup>-1</sup>) producing 6 shoots per seed. Regarding the length of the shoot, no treatment exceeded the control (8.07cm). Finally, *in vitro* germination was high (56-97%) in all treatments.

**Key words:** direct organogenesis, *in vitro* culture, cytokinins, rescate.

**Recibido:** febrero 18 de 2020      **Aprobado:** mayo 26 de 2021

## INTRODUCCIÓN

La familia Asparagaceae incluye a los géneros, *Calibanus*, *Beaucarnea Dasyllirion* y *Nolina* y más de 50 especies adaptadas a las zonas áridas y semiáridas de México (Hernández 1992). Algunas especies de la familia Asparagaceae tienen varios usos; de acuerdo a Poinar (2001), *Dasyllirion* y *Nolina* formaron parte de la dieta de naturales americanos, aunque no especifica a que grupo étnico se refiere. Las hojas del género *Nolina* son empleadas como materia prima para fabricar escobas de paja, canastos y techado de casas o bien para la fabricación de sotol como es el caso de *Dasyllirion* (Reyes, et al., 2013). La especie *Nolina cespitifera* se explota para la obtención de fibra usada para cordelería, actividad que representa un renglón sumamente importante para la economía de habitantes de las zonas áridas y semiáridas de sur de Coahuila y Nuevo León y norte de Zacatecas (Castillo, 2004). Otras con usos medicinales, farmacológicos y etnobotánicos otras tienen uso medicinal y etnobotánico (Gioanetto y Franco, 2004). El uso más común es ornamental, lo cual lo hace comercial (Hernández, 1992). En el caso de *Calibanus hookeri*, conocida como “sacametacate”, “tinaja” se desconoce si aparte de ser decorativa tenga alguna otra utilidad. De acuerdo a Giral (1986) estudios de propiedades fitoquímicas de la especie, revelaron la presencia de una saponina que llamaron calibagenina, nada medicinal. Es una planta fascinante caudiforme de los desiertos del norte de México, endémica de los estados de Hidalgo, Tamaulipas y San Luis Potosí; forma un caudex grande que alcanza diámetros y alturas de hasta 90 cm (Hernández-Sandoval (2020). Encima del caudex brotan hojas muy angostas de color verde grisáceo que parecen hierba. Cada roseta de hoja cultivada a partir del caudex se cree que es una planta independiente producida vegetativamente que muere después de la fructificación para ser remplazada por una nueva. Su aspecto la hace atractiva como una planta rara, decorativa y por ser una planta de tolerancia a zonas áridas o semiáridas (Trelease 1911; Hernández-Sandoval, 2020, rarepalmseeds 2021). Estas características pueden provocar saqueo irracional a tal grado que la ponga en peligro en su hábitat natural causando que sus poblaciones estén disminuyendo de manera preocupante de tal manera que en México está ubicada en la categoría de amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2010). *Calibanus hookeri* es una planta que en

el mercado nacional llega tener un precio de hasta \$2,000.00 MN y en los Estados Unidos de América un precio de entre 50 hasta 70 USD (1,000.00 y 1,400.00 MN). El valor de la planta está determinado por la altura del caudex (Figura 1) de tal forma que a mayor tamaño así será el costo. Esto pudiere explicar el por qué las plantas jóvenes y adultas son extraídas de manera irracional e ilegal causando la disminución o inclusive la desaparición de las poblaciones silvestres.

*Calibanus hookeri*, hasta donde sabemos, solamente se propaga por semilla (Figura 1), pero el desarrollo de la semilla, no es constante, es errática; sin embargo, cuando existe la simiente, la depredación ilegal impide la conservación de la especie en su hábitat natural (Franco 1995). La planta es vendida en el mercado europeo, según Tropical Centre, es de entre 144 a 157 € (3,653 a 3995 MN); en el mercado asiático (Bangkok, BA, Tailandia) de acuerdo a eBay, en marzo de 2017, *Calibanus hookeri* considerada como planta exótica, tiene un costo de 77.77 USD (1,513.00 MN). En cuanto a la semilla (según Tropical Centre y Rarepalmseeds) se vende en el mercado europeo, a un costo de entre 50 y 75 libras esterlinas (1.442.5 a 2. 163.75 MN). En consecuencia, es una planta con alto valor comercial y de este ángulo se establece el interés que existe por esta planta en el mundo.

Los factores pastoreo, factor económico por la venta de planta y semilla, han limitado la regeneración natural de la planta y provocado la reducción e incluso la desaparición de las poblaciones silvestres (López 1986). La amenaza y pérdida de especies es especialmente grave cuando las especies son endémicas como es el caso de



**Figura 1.** Planta adulta de *Calibanus hookeri* mostrando la fructificación.

*Calibanus hookeri* (Reyes-Silva *et al.*, 2013). En estas circunstancias existe la necesidad de implementar métodos eficientes de propagación que permitan su conservación y mantenimiento para la restauración de las poblaciones naturales. Sin embargo, se tienen que resolver, por un lado, como conocer la capacidad germinativa de la semilla, sobre todo porque, según Pence (2011), *Calibanus hookeri* no se puede multiplicar asexualmente y mucho menos lograr inducir la propagación masivamente de plantas. El problema de su reproducción se agudiza porque si bien la planta se puede propagar por semilla, también es cierto que no hay nada de información sobre cuál es la época de floración y la edad de planta para floración y por supuesto para fructificación que permita hacer recolectas de semilla. En este sentido, no hay información en la literatura disponible de esta especie desde el punto de vista científico; no obstante, *Calibanus hookeri* es muy apreciada como planta ornamental. Uno de los métodos de propagación menos usado y fomentado es la técnica de cultivo de tejido vegetal. Sin embargo, esta técnica empleada para fines de conservación ha cobrado poco a poco importancia; de acuerdo a Sarasan *et al.*, (2006) y Sarasan (2010), en los años de 1995 a 2005, aún eran muy pocos los trabajos existentes al respecto. Una de las ventajas del cultivo *in vitro* radica en que es un proceso que no requiere de nuevo material biológico de campo cuando ya se tiene tejido u órganos bajo reproducción continua, por lo que es una herramienta que se puede aplicar como alternativa de conservación. Con estas consideraciones, en este trabajo se utilizaron citocininas para inducir la generación de brotes en explantes basales, puesto que estas citocininas controlan de la diferenciación celular regulando la formación y el desarrollo del tallo. Se evaluó el efecto de cuatro citocininas (BA, TDZ, K y 2iP) en tres concentraciones para conocer la capacidad de germinación de la semilla, así como el empleo de citocininas para estimular o inducir la generación de brotes que permita establecer un protocolo para la micropropagación de *C. hookeri* a partir de plántulas de semillas germinadas *in vitro*. Es importante mencionar que para esta especie no existen investigaciones o reportes previos sobre su cultivo y su propagación *in vitro*.

## MATERIALES Y METODOS

Las semillas de *Calibanus hookeri* (Figura 1) utilizadas en la investigación fueron cosechadas en 2019 en el Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México y donadas por MC Marcial Pineda encargado del mencionado jardín y quien hizo la identificación de la planta. Este estudio se realizó en dos etapas: la germinación y la micropropagación a partir de las

plántulas de semillas germinadas *in vitro* de *C. hookeri*. Para evaluar la viabilidad de la semilla se seleccionó el método de flotación en agua destilada y se emplearon sólo aquellas que se observaron en el fondo de un vaso de precipitado. La investigación se desarrolló en el laboratorio de Embriogénesis perteneciente al Posgrado de Fruticultura ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Posgraduados en 2019.

### Desinfección de la semilla

A las semillas seleccionadas se les retiró la testa con pinzas de punta fina y se lavaron con agua jabonosa por 10 minutos. Para la desinfección, las semillas se sumergieron en peróxido de hidrogeno al 3% v/v por cinco minutos y posteriormente se enjuagaron con agua de la llave, tres veces, por dos minutos. Se colocaron en cloro comercial (hipoclorito de sodio, 6% de cloro activo) más dos gotas de Tween 80 por cinco minutos. Se lavaron tres veces con agua bidestilada esterilizada en condiciones asépticas. Antes de la siembra, las semillas se impregnaron con B enomyl para controlar la posible presencia de hongos.

### Germinación

Con la finalidad de obtener plántulas asépticas para inducir organogénesis y la multiplicación, las semillas se sembraron en tubos de ensayo con 20 ml de medio básico MS (Murashige y Skoog 1962) complementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo inositol, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 0.5 mg.L de ácido nicotínico, 0.5 mg.L de piridoxina HCl, más 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y se solidificó con 8g.L<sup>-1</sup> de agar (Sigma-Aldrich) complementado con cuatro citocininas: benciladenina (BA), tidiazuron (TDZ), cinetina (K) y 6- $\gamma,\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2ip) en concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.0 mg L<sup>-1</sup> y el testigo sin hormonas. El pH del medio se ajustó a 5.7-5.8 con un potenciómetro digital (Apera Instruments AI521 PH800) y se esterilizó autoclave vertical a 1.5 kg cm<sup>2</sup> a 120 °C por 15 min. Se sembró una semilla por tubo de ensayo de 150 x 25 mm en campana de flujo laminar previamente desinfectada y se realizaron 30 repeticiones por tratamiento y con el testigo para un total de 390 semillas. Los tubos de ensayo se incubaron en la cámara de crecimiento a 27  $\pm$  1°C con una intensidad de 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> provisto por lámparas fluorescentes de luz blanca-fría y un fotoperiodo de 16 h de luz. Las semillas se monitorearon diariamente durante 28 días para registrar el porcentaje de germinación. Se consideró como semilla germinada cuando la radícula comenzó a emerger (Ranal y García de Santana, 2006). A los 28 días, las plántulas se sacaron del tubo para evaluar el número y longitud de los brotes, para posteriormente pasar esos brotes a medio MS sin hormonas para su enraizamiento.

## Multiplicación

Cuando los brotes obtenidos de las semillas germinadas *in vitro* alcanzaron los 28 días de edad y un tamaño de 1 cm se sembraron verticalmente, pensando en no afectar la polaridad de los brotes, en el medio basal MS y con la finalidad de inducir o provocar la brotación múltiple se adicionaron las cuatro citocininas a las mismas concentraciones empleadas para la germinación. Se inocularon 30 tubos por tratamiento colocando un brote por tubo de ensayo. Las observaciones se hicieron mensualmente durante dos meses.

## Enraizamiento

Para esta parte del trabajo se emplearon 50 plántulas de entre 5 cm 8 cm de longitud, aproximadamente, que se incubaron en medio MS sin hormona en condiciones  $25 \pm 2$  °C y luz continua por 45 días dentro de tubos de ensayo. Al final del tiempo se registró el porcentaje de enraizamiento. Las plántulas se transfirieron a macetas de plástico con una mezcla de tierra de monte con perlita en proporción de 1:1 y se sellaron con plástico transparentes, conservando la humedad relativa alta. Las macetas se mantuvieron en el cuarto de incubación. A la cubierta, después de una semana se le hicieron perforaciones, aproximadamente cinco o seis, con un alfiler. Este procedimiento se realizó haciendo más perforaciones hasta descubrir la caja por completo al mes

## ANALISIS ESTADISTICO.

Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación, número y longitud de brotes. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 30 repeticiones para cada tratamiento, un tubo como unidad experimental; se usó como prueba de comparación de medias el número y longitud de brotes (Tukey, 0.05) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Germinación

La observación de la germinación de la semilla se inició a los cuatro días después de la siembra y el proceso terminó hasta los 28 días. Los primeros brotes comenzaron a aparecer a los 7 días. Los tiempos de germinación son parecidos a los señalados por Reyes *et al.*, (2013) quienes mencionaron que la germinación *in vitro* de las semillas de *Beaucarnea gracilis*, *Dasyllirion leiophyllum* y *Dasyllirion serratofolium* comenzó a observarse a los ocho días y hasta a los 28. Entre los 12 y 15 días apareció la vaina cotiledonar que posteriormente dará origen al caudex en plantas adultas. Con relación a las hormonas de crecimiento, las tasas mayores de germinación se dieron con BA y TDZ primordialmente en las concentraciones de 5.0 mg L<sup>-1</sup> con valores de 97% y 90%, respectivamente. Vadillo (2012) indicó que las semillas de *Beaucarnea purpusii* y *B. compacta* tuvieron porcentajes de germinación *in vitro* mayor al 90% en medio de cultivo MS semi-sólido. Guillén *et al.* (2015) con *Beaucarnea inermis* y Osorio- Rosales y Mata-Rosas (2005), en *Beaucarnea gracilis* y *B. recurvata*, reportan que después de 30 días de haber sembrado las semillas, se registraron porcentajes de entre 89 a 95% de germinación. La concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA o TDZ dio valores de germinación de 87 %. Para la concentración con 7 mg L<sup>-1</sup> el porcentaje con BA fue de 87 de germinación, seguido del tratamiento con TDZ con 86%. En cuanto a la K la mejor respuesta fue con 2.5 mg L<sup>-1</sup> y una tasa de germinación de 70% y la de menor respuesta fue con 7.0 mg L<sup>-1</sup> (56%). Por último, los tres tratamientos con 2ip dieron datos menores a 70%. De las cuatro citocininas ensayadas la que obtuvo mejores resultados en cuanto a germinación fue BA (Figura 2).

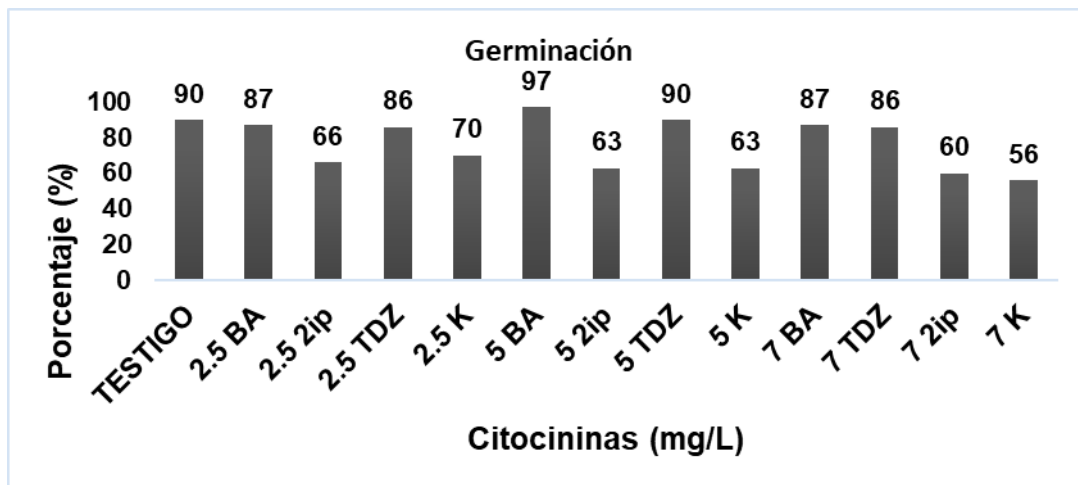


Figura 2. Porcentaje de germinación de semillas de *C. hookerii* con diferentes concentraciones de 6-benciladenina; 2ip= 2-isopentil adenina TDZ=tidiazuron; K= cinetina

## MULTIPLICACIÓN

Para la multiplicación se utilizaron las mismas citocininas que se emplearon en la germinación. Sin embargo, no todos los tratamientos fueron capaces de inducir la generación de brotes múltiples en *Calibanus hookeri*.

Después de los 28 días se observó que alrededor de 180 brotes dejaron de crecer y no continuaron su desarrollo, algunas de ellas estaban deformadas, posiblemente hiperhidratación, sin producción de brotes, debido a lo cual número de muestras inicial (30), solo quedaron 15 plántulas por tratamiento. En general, el número de brotes generados varió con las distintas citocininas. La prueba estadística demostró que existieron diferencias significativas en el efecto de las citocininas en el número de brotes. Se pueden observar las diferencias significativas entre las concentraciones de BA y el resto de las citocininas. Los tratamientos con BA fueron altamente eficientes produciendo 18, 26 y 13 brotes por explante en las concentraciones de 2.5, 5.0, y 7.0 de BA, respectivamente; el TDZ también mostró alta eficiencia en la formación de brotes, 11.3 por explante solamente en la

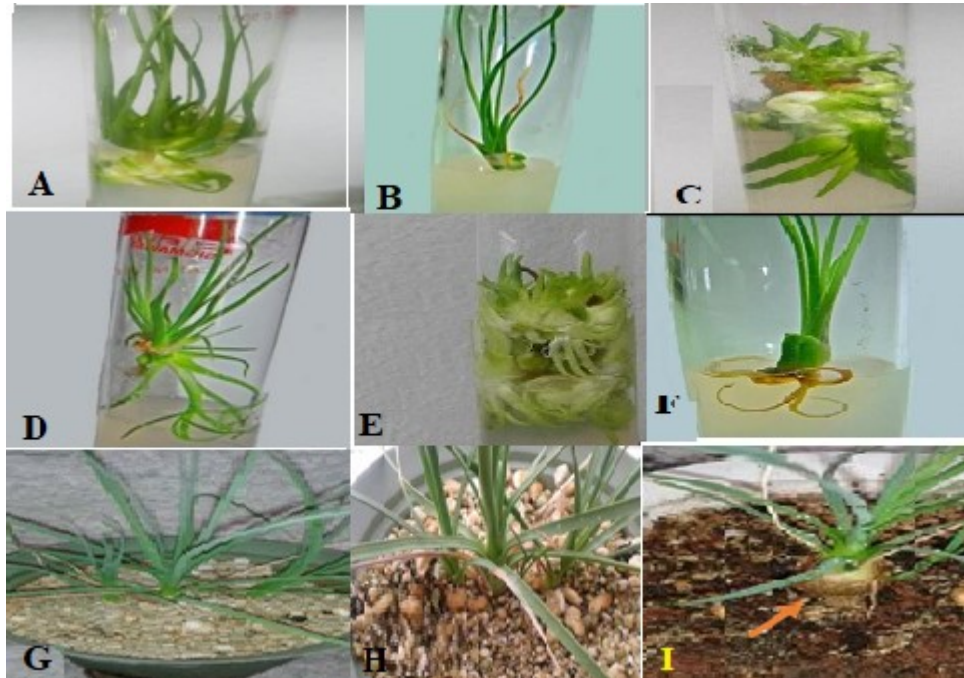
concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup>; los resultados más bajos se observaron en 5.0 mg L<sup>-1</sup> de K. Se pueden observar las diferencias significativas entre las concentraciones de BA y el resto de las citocininas. Los resultados para la variable número de brotes se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se encontraron respuestas similares a las mencionadas por diversos autores para especies de la *Nolina* y se coincidió que las mejores respuestas se observaron en los tratamientos con BA. Reyes *et al.*, (2013) en la propagación *in vitro* de *Nolinas* mexicanas reporta que la mayor respuesta del número de brotes se observó con 3 mg L<sup>-1</sup> de BA para *Dasyllirion leiophyllum*, donde se produjeron en promedio más de 10 brotes por explante. La menor respuesta se observó en *Beaucarnea goldmanii*, que en su mejor tratamiento generó casi cuatro brotes por explante con BA.

Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005) experimentando con varias concentraciones de BA señalaron que con 5 mg L<sup>-1</sup> en *Beaucarnea gracilis* en explantes basales de

**Tabla 1.** Efecto de la concentración de cuatro citocininas en el número y longitud de brotes de plántulas de *Calibanus hookeri*. letra diferente dentro de cada columna indica diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). BA= 6-benciladenina; 2iP= 2-isopentil adenina;TDZ= tidiazuron; K= cinetina

Citocinina	Número brotes por explante	Número brotes totales	Longitud de brotes (cm)
<b>BA (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
2.5	18.067 b	330	3.03d
5.0	26.0 a	400	5.10c
7.0	13.86 cd	250	2.71d
<b>TDZ (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
2.5	11.13 cd	167	2.23d
5.0	5.33ef	80	2.65d
7.0	5.10ef	70	2.45d
<b>2ip (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
2.5	-----	-----	-----
5.0	-----	-----	-----
7.0	6.4 edf	95	7.15a
<b>K (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
2.5	2.0 f	30	5.89c
5.0	8.13 ed	150	5.33c
7.0	5c	80	5.87c
<b>Testigo</b>	<b>1.0</b>	<b>15</b>	<b>8.07a</b>



**Figura 3.** Respuesta de semilla de *C. hookerii* a los tratamientos con diferentes citocininas. A. 2.5 mgL<sup>-1</sup> de BA. Formación de tallos adventicios; B. 2.5 mgL<sup>-1</sup> de K germinación con formación de hojas C. 5 mgL<sup>-1</sup> de BA desarrollo de tallos adventicios múltiples; D. 7 mgL<sup>-1</sup> de 2ip. Formación de tallos; E. 7 mgL<sup>-1</sup> de BA. Regeneración de múltiples tallos; F. 2.5 mgL<sup>-1</sup> de TDZ Formación del caudex y raíz; F. Testigo G. Plantas regeneradas de 8 meses con plántulas adventicias mostrando el caudex (flecha) y plantas de 25 meses.

produjeron 5.4 brotes/explante y en los explantes fueron inoculados en 3 mg L<sup>-1</sup> y la producción fue de 1.9 brotes/explante. Vadillo (2012) encontró que el tratamiento más efectivo para la propagación de *Beaucarnea compacta* fue el medio de cultivo semi-sólido adicionado con 5 mg L<sup>-1</sup> de BA y Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008), en *Agave inaequidens* indujeron 11.8 y 11.7 brotes en concentraciones de 6 y 8 mg L<sup>-1</sup> de BA, respectivamente. Castañeda y Santacruz (2008) reportan para *Beaucarnea recurvata* L, a una concentración de 7.5 mg L<sup>-1</sup> un promedio de 5.8 brotes por explante y Guillén *et al.* (2015), encontraron que a una concentración de 6 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA para la inducción de brotes en hoja produjo 8 brotes en promedio. Con relación al TDZ, los resultados de Reyes *et al.* (2013), señalan que esta hormona, que es una citocinina sintética de alta actividad y que es usada sobre todo en especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993) generan, en las especies de los géneros *Beaucarnea* y *Dasyllirion*, brotes con hojas curvas y deformes, y en menor cantidad con respecto a 2ip (Reyes *et al.*, 2013). Esto significa que este compuesto tiene efectos no deseables en las especies de Nolinaceae. En *C. hookerii* se observó el mismo efecto que reporta Reyes *et al.* (2013), pero solamente en concentración de 7.0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, los brotes no desarrollaron hojas y cuando se formaron se deforma-

ron, por lo que este tratamiento se excluyó. En algunas especies de Agave se ha visto que el TDZ resulta más eficiente para la generación de brotes respecto a otras citocininas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Sin embargo, para Luna *et al.* (2014), la proliferación *in vitro* de brotes de Agave americana var. oaxacensis, se estableció diversas concentraciones de benciladenina (BA) desde 2 hasta 10 mg L<sup>-1</sup>. El hecho es que las citocininas que se emplearon en este trabajo causen diferentes efectos pudiere deberse a su concentración y a su origen ya que mientras unas son naturales como el 2iP otras son sintéticas como el BA, TDZ y la K (Lu, 1993; Strnad, 1997). Es importante mencionar que no existen antecedentes de la micropropagación de *Calibanus hookerii*, por lo tanto, es la primera evidencia que con el protocolo establecido en esta investigación es posible lograr su multiplicación masiva.

#### Longitud de brote

Las pruebas estadísticas demostraron que, para la longitud del brote, no hubo diferencias significativas entre las cuatro citocininas. Las mejores respuestas fueron con 7 mg L<sup>-1</sup> de 2ip con un promedio de 7.15 cm; la longitud de brotes 5.59 cm se logró con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de K y con 5 mg L<sup>-1</sup> de BA la longitud fue 5.10 cm y 5 mg L<sup>-1</sup> de K con 5.33 cm, sin embargo, hay una tendencia que indica

que la concentración de 7 mg L<sup>-1</sup> de 2ip con un promedio de 7.15 cm es ligeramente más eficiente de los demás tratamientos. Los datos comparativos de las cuatro citocininas se presentan en la tabla 1. Cabe mencionar que la concentración de 7 mg L<sup>-1</sup> de 2ip (7.15 cm) fue la única de todas las citocininas ensayadas en donde se observó una respuesta similar al testigo para la longitud de los brotes. En general, la longitud de los brotes varió con las distintas citocininas. La prueba estadística muestra que existen diferencias cuantitativas significativas en el efecto de las citocininas (Tabla 1).

Para *Calibanus hookerii*, al adicionar K al medio MS, a concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup> esta fue de las más bajas en cuanto a la producción de brotes por semilla (2 brotes en promedio), pero fue una de las más altas en cuanto a la talla del brote (5.89 cm). En la concentración con 5 mg L<sup>-1</sup> se contó un promedio de 8 brotes por semilla y una la longitud de 7.15 cm que fue la más altas con respecto a los demás tratamientos y similar al testigo. En las observaciones cualitativas la concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> no regeneró formación de raíz, parece ser y de acuerdo a lo reportado por Vázquez (2001) la K inhibe el desarrollo de raíces.

Es importante mencionar que no existen antecedentes de la micropropagación de *Calibanus hookerii*, por lo tanto, es la primera evidencia que con el protocolo establecido en esta investigación es posible lograr su multiplicación masiva.

### Enraizamiento

La formación de raíz *in vitro* en plántulas individualizadas se presentó cuando se inocularon medio MS se adicionó 5 mg L<sup>-1</sup> de BA. Se registró hasta 100% de raíz y se observó supervivencia 90 días después del trasplante bajo condiciones de invernadero.

### CONCLUSIONES

Se establecieron los protocolos tanto para la aceleración de germinación como para la micropropagación masiva de plantas a partir de brotes obtenidos de semilla de *Calibanus hookeri*. La adición de las citocininas contribuyó a incrementar la germinación de la semilla de *Calibanus hookeri* lográndose valores significativos en el porcentaje de germinación en comparación con el testigo. La adición de BA y TDZ fueron de alta eficiencia en la producción de brotes; Sin embargo, las concentraciones de BA fueron muy relevantes en la formación de brotes; el tratamiento con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de K fue la concentración con menor generación de brotes (30). Los brotes generados, producto de la germinación de las semillas, se pueden emplear perfectamente como planta madre

para la micropropagación intensiva de plántulas y para establecer como un procedimiento comercial con una tasa de producción alta. El establecer el protocolo para la producción masiva de plántula se magnifica debido a la dificultad de conseguir semilla. Los resultados confirman que las cuatro citocininas empleadas fueron eficientes y con efecto positivo en el germinación y multiplicación de las plántulas, sin embargo, el uso de BA fue fundamental para inducir la mayor cantidad de brotes y por supuesto para la propagación masiva de *Calibanus*. Con los resultados observados en esta investigación se muestra que las citocininas estimulan la formación de brotes.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Colegio de Postgraduados por el apoyo financiero para realización de esta investigación

### REFERENCES

- Acebedo, M.M.; Liñán, J.; Lavee, S. Troncoso, A. (1997). *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae* 69. Pp 207-215. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00004-6).
- Aureoles-Rodríguez, F.; Rodríguez de la O., J. L.; Legaria-Solano, J. P.; Sahagún-Castellanos, J.; Peña-Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3): 263- 269
- Baskin, C.C. Baskin, J.M. (1998). Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1238>.
- Broschat, T.K. (1998). Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (*pindo palm*) seed germination. *HortTechnology. American Society for Horticultural Science*, 8 (4): 586-587. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.8.4.586>.
- Cantos, M, Cueva, J. Zarate, R. Troncoso, A. (1998). Embryo rescue and development of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*. *Seed Science and Technology*, 26: 193-198. <http://hdl.handle.net/10261/47283>.
- Castañeda-Nava, J. J., Santacruz- Ruvalcaba, F. (2008).

- Propagación masiva *in vitro* de pata de elefante (*Beaucarnea recurvata* Lemaire (*Nolinaceae*)). Avances en la investigación científica en el CUCBA. ISBN: 978-607-00-2083-4. <https://es.scribd.com/document/202556808/Propagacion-in-vitro-pata-de-elefante>.
- Castillo De, M.G. y Barceló, M.A. (2004). Cultivo horizontal de segmentos uninodales de plantas de *Prosopis alba* Griseb. (Leguminosae). Misiones, Arg. <http://www.factor.unam.edu.ar/silman/cultivocastillo.pdf>.
- Domínguez- Rosales, M. S., Alpuche-Solís A. G.; Vasco-Méndez N. L y Pérez Molphe Balch E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Rev. Fitotec. Mex.*31 , (4): 317 - 322. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61031403>.
- E Bay (2021). <https://www.ebay.com> Consultado 09/03/2021.
- Giral, F., Álvarez, J.H. y Hidalgo, C.H. (1966). Saponina y sapogenina del sacamecate (*Calibanus hookeri*). CIENCIA Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas, 24(5-6): 233-236.
- Guillén, S., Martínez-Palacios, A. Martínez, H. Martínez-Ávalos, J. G. (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (*asparagaceae*), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*, 93 (2), 1-10. <https://doi.org/10.17129/botsci.129>.
- Gioanetto, F. Franco, J. E. (2004). Usos medicinales y etnobotánicos de las *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México y Centroamérica. In: Simposio Internacional sobre *Agavaceae* y *Nolinaceae*. Mérida, Yucatán. <http://www.cicy.mx/eventos/agaves/resumen.pdf>. pp 6-7.
- Hernández, S. L. (1992). Una especie nueva de *Beaucarnea* (*Nolinaceae*). *Acta Bot. Mex.*,18, 25-29. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57401805>.
- Hernández, L. (1992). Una especie nueva de *Beaucarnea* (*Nolinaceae*). *Acta Botánica Mexicana*. 18: 25-29 .
- Hernández-Sandoval, L. (2020). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo, 213, 40 p.
- Huetteman, C. A., Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33: 105-119. <https://doi.org/10.1007/BF01983223>.
- López, M. L. (1986). Esfuerzo reproductivo y sobrevivencia de *Nolina parviflora* (*Liliaceae*) en la zona semiárida Poblano-Veracruzana. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx., p. 89.
- Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.*, 29: 92-96. <https://doi.org/10.1007/BF02632259>
- Matthys-Rochon, E., Piola, F., Le-Deunff, E., Mol R, Dumas, C. (1998). *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. *Jexp bot. Oxford: Oxford University Press*. 49 (322),839-845.
- Molphe, B. E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Rev. Fitotec. Mex.*, 31 (4): 317 - 322. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61031403>.
- Murashige,T., Skoog,F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Osorio-Rosales, M.L., Mata-Rosas M. (2005). Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *HortScience*, 40:1481-1484.
- Pence, V. C. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47: 176-187. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9323-6>.
- Poinar, H. N., Kuch, M., Sobolik, K. D., Barnes, I., Stan-kiewiczzi, A. B., Kuder, T., Spaulding, W. G., Bryant, V. M., Cooper A., Pääbo, S. (2001). A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native



- Americans. PNAS 98:4317-4322. <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.061014798>.
- Ranal, M.A., Garcia de Santana, D. (2006). How and why to measure the germination process. *Rev. Brasil. Bot.*, 29(1): 1-11. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>.
- Reyes-Silva, A. I, Morales- Muñoz, C. F., Pérez- Reyes, M. E., Pérez- Molphe, B.E. (2013). Propagación *in vitro* de *nolinaceas* mexicanas. Número 58. Investigación y Ciencia. Mayo-Agosto. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67428815002>.
- Rivera-Lugo, M. y E. Solano. (2012). Nolinaceae en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, 3: pp.99.
- SAS Institute. (2000). *Statistic and Graphics Guide*. Version 9. North Carolina, U.S.A.
- Sarasan, V. (2010). Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bulletin*, 65 (4), 549.
- Sarasan, V, Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C. and McMichen, M. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42 (3), 206-214. <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>.
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101: 674-688.
- Tropical Centre. <https://www.tropicalcentre.com/home>. Consultado 09/03/2021
- Tropical Centre. <https://www.tropicalcentre.com/calibanus-hookeri-caudex-diam-25-30-cm.html> 26 de octubre de 2018. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>.
- Rarepalmseeds. *Calibanus hookeri*. Consultado el 10 de junio de 2021. <https://www.rarepalmseeds.com/calibanus-hookeri>
- Rivera-Lugo, M. y E. Solano. (2012). Nolinaceae en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, 99.pp. 3. V.
- R García-Mendoza, A y R. Galván. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56: 7-24.
- Vadillo, P.M del C. (2012). Organogénesis y regeneración de *Beaucarnea compacta* L. y *Beaucarnea purpusii* Rose, especies endémicas amenazadas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Octubre. p. 38.
- Viveros san Marcos. [https://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant\\_id=289](https://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=289).