

## ESTABLECIMIENTO *in vitro* Y REGENERACIÓN CELULAR DE *Dasyilirion acrotrichum* EN LA MIXTECA POBLANA

### *In vitro* ESTABLISHMENT AND CELLULAR REGENERATION OF *Dasyilirion acrotrichum* IN MIXTECA POBLANA

Aguilar-Jiménez, D.<sup>1\*</sup>; Piña-Guillén, J.<sup>1</sup>, González-Vicente, R. D.<sup>2</sup>, Herrera-López, H.<sup>2</sup>, Salgado-Bravo, R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa Educativo de Agrobiotecnología. <sup>2</sup>Programa educativo de Agricultura Sustentable y Protegida. Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma, No. 168, Barrio de Santiago Mihuacán. Izúcar de Matamoros. Puebla, México. C.P. 74420.

\*Autor para correspondencia: [daniel.aguilar@utim.edu.mx](mailto:daniel.aguilar@utim.edu.mx) / [aguilard229@gmail.com](mailto:aguilard229@gmail.com)

**Recibido:** 31/marzo/2021

**Aceptado:** 13/junio/2022

#### RESUMEN

Como estrategia para recuperar y preservar especies amenazadas o en peligro de extinción, se recurrió al cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* para el establecimiento y regeneración celular de *Dasyilirion acrotrichum*, conocida como “cucharilla” en la Mixteca Poblana (México); la cual, tarda entre 10-12 años para llegar a producir semilla y sólo se encuentra de manera silvestre en cerros y montañas. Para ello, se compararon dos protocolos de desinfección de explantes (yemas laterales): hipoclorito de sodio al 10 y 20 % (v/v). Posteriormente, los explantes se sembraron en un medio de cultivo con sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) (1962), adicionando N-6-

Bencilaminopurina (BAP) 3.0 mg·L<sup>-1</sup>, tiamina 0.4 mg·L<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg·L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup> y agar 8 g·L<sup>-1</sup>, ajustando el pH a 5.7 ± 0.01. El efecto de BAP en la regeneración celular de *D. acrotrichum*, se evaluó adicionando por separado, cinco concentraciones (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg·L<sup>-1</sup>) a un medio de cultivo MS ya antes descrito. Después de sembrar un brote de *D. acrotrichum* en cada tubo de ensayo, los recipientes se colocaron en el área de incubación a 28 ± 2 ° C con 16 horas luz y 8 horas de obscuridad durante ocho semanas. Se evaluó: porcentaje de explantes no contaminados por microorganismos, explantes fenolizados y explantes con respuesta morfogénica; así como formación y longitud de brotes y raíz. Los resultados indicaron que el empleo de yemas laterales

de plantas de campo y la adición de BAP ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) al medio de cultivo MS, ofrece una excelente alternativa biotecnológica para cultivar plantas de *D. acrotrichum in vitro*.

**Palabras clave:** Desinfección, Callo, Citocinina, Rescate, Cucharilla.

## ABSTRACT

As a strategy to recover and preserve threatened or endangered species, *in vitro* plant cell and tissue culture was used for the establishment and cellular regeneration of *Dasyliirion acrotrichum*, known as "cucharilla" in the Mixteca Poblana (Mexico); which takes between 10-12 years to produce seed and is only found in the wild in hills and mountains. For this, two protocols for disinfection of explants (lateral buds) were compared: sodium hypochlorite at 10 and 20 % (v / v). Subsequently, the explants were seeded in a culture medium with the inorganic salts of Murashige and Skoog (MS) (1962), adding N-6-Benzylaminopurine (BAP)  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , thiamine  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and agar  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , adjusting the pH to  $5.7 \pm 0.01$ . The effect of BAP on the cell regeneration of *D. acrotrichum* was evaluated by separately adding five concentrations of this growth regulator ( $0.5, 1.0, 2.0, 3.0$  and  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to an already described MS culture medium

and pH was adjusted to  $5.7 \pm 0.01$  for each treatment. After planting a sprout of *Dasyliirion acrotrichum* in each test tube, the containers were placed in the incubation area with 16 hours of light and 8 hours of darkness for eight weeks. It was evaluated: percentage of explants not contaminated by microorganisms, phenolized explants and explants with morphogenic response; as well as the formation and length of shoots and roots. The results indicated that the use of lateral buds from field plants and the addition of BAP ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to the MS culture medium, offers an excellent biotechnological alternative to grow *Dasyliirion acrotrichum* plants *in vitro*.

**Keywords:** Disinfection, Callus, Micropropagation, Rescue, Preservation.

## INTRODUCCIÓN

*Dasyliirion acrotrichum* es una planta fanerógama que pertenece a la familia *Nolinaceae*, es nativa del centro y norte de México, y también se encuentra desde el sur de Estados Unidos hasta Centroamérica (Reyes-Silva *et al.*, 2013), específicamente en la Mixteca Poblana, se le conoce comúnmente como "cucharilla". Las hojas son de color verde claro a verde grisáceo, son perennes y alargadas con espinas en los márgenes y recubiertas de una capa de hidrocarburos que forman una cutícula

gruesa y su apariencia no es pubescente ya que no presenta tricomas (Reyes-Silva *et al.*, 2013), son estrechas (1 cm de ancho) y pueden llegar a medir hasta 1 m de longitud formando una roseta, radial y simétrica de 1.8 m de diámetro y altura, forma un escapo floral en verano con pequeñas flores de color blanco y se distribuye en gran parte de México de forma restringida, siendo los estados más representativos: San Luis Potosí, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Querétaro, Veracruz, Puebla y Morelos (Bravo-Hollis, 1978; Rzedowski, 2006). En el estado de Chihuahua es conocida como sotol, de donde se obtiene una bebida alcohólica y es considerada un recurso fitogenético importante ya que tolera sequía y es resistente a temperaturas de  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  y también llega a emplearse como planta de

ornato en jardines (Melgoza y Sierra, 2004). Sin embargo, el uso principal que le dan en la Mixteca Poblana (México) es para elaborar adornos en las fiestas patronales, donde los pobladores mencionan que se llegan a emplear entre 20 a 30 plantas por arco floral (Figura 1). Mata-Labrada (2007) menciona que mínimo se emplean 30 plantas para dicho fin. No obstante, cada planta demora entre 10 a 12 años para llegar a la edad adulta y emitir semilla, aunando, que el escapo floral también es empleado como adorno o como alimento. Es tal su empleo, que personas del estado de Morelos también vienen por ella al estado de Puebla desde el año 2009, sin embargo, nadie la cultiva y ya se encuentra catalogada en la NOM-059-ECOL-2000 como especie amenazada (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).



**Figura 1.** Arcos florales a partir de cucharilla (*Dasylyrion acrotrichum*) adornado el palacio Municipal de Izúcar de Matamoros, Puebla, México, durante un desfile en el mes de septiembre.

Si se dejara florecer y madurar, una opción para su propagación es el empleo de semillas según Probert *et al.* (2009), quienes reportan alta capacidad germinativa de las semillas de estas plantas, no obstante, Vega-Cruz *et al.* (2006), mencionan que puede presentar problemas de germinación bajo condiciones naturales ya que son diversos factores que influyen en ello; además, presentan una enorme variación tanto en la germinación como en las características de las plántulas obtenidas, respuestas que puede deberse a la recombinación genética que sufren durante la polinización (Arzate-Fernández *et al.*, 2019). Por lo tanto, de no detener su saqueo o de no encontrar una forma de reproducción para recuperar poblaciones en decrecimiento, podría llegarse a su extinción local en un corto plazo (Matthies *et al.* 2004). Como alternativa para su propagación, rescate y conservación, está el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*, técnica que permite recuperar y preservar especies vegetales amenazadas o en peligro de extinción (Rodríguez y Pineda, 1985; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019). Para ello, existen varios trabajos de cultivo *in vitro* con resultados diferentes según la planta trabajada, un ejemplo de ello, es lo mencionado por Bello-Bello *et al.* (2015) en cultivo *in vitro* de vainilla (*Vanilla*

*planifolia* Jacks) bajo condiciones de lento crecimiento, empleando las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) (1962) y adicionando N-6-Bencilaminopurina (BAP) para la regeneración de brotes. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) reportan la conservación y regeneración *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl empleando diferentes concentraciones de medio MS (1/4, 1/2 y 3/4) y el empleo de Thidiazuron (TDZ) y BAP para la regeneración *in vitro*, obteniendo mejor respuesta con BAP. Fufa *et al.* (2019) reportan un protocolo para la regeneración de *Jatropha curcas* L. mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales empleando un medio MS adicionado con BAP y ácido indolbutírico (AIB) para la inducción de brotes, sin embargo, el mayor número de brotes obtenidos fue en un medio MS con BAP y kinetina (kin). Para *Agave potatorum* Zucc, Aguilar *et al.* (2018a) reportan el empleo de medio MS (1962) adicionado con tres citocininas y tres auxinas para la multiplicación *in vitro*, obteniendo mejor respuesta con BAP más AIA. De igual forma, Aguilar y Rodríguez (2018b) reportan un protocolo para la micropropagación de *Agave marmorata* empleando BAP y AIA en un medio MS. En el caso específico de *Dasyilirion*, existen

algunos estudios por Reyes-Silva *et al.* (2013), empleando las sales MS (1962) para evaluar benciladenina (BA), 6- $\gamma,\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP), tidiazurón (TDZ) y [N6-(meta-hidroxibencil) adenina] o metatopolina (MT) para la multiplicación *in vitro* de *D. leiophyllum*, *D. longissimum*, *D. lucidum* y *D. serratifolium*, pero no para *D. acrotrichum*. Por otra parte, para lograr cualquier respuesta morfogénica, es fundamental contar con material vegetal establecido *in vitro*, es decir, explantes libres de microorganismos y sin daños por necrosis ya sea por fenolización de los mismos o por quemaduras durante el proceso de desinfección, de no controlar estos inconvenientes, las respuestas morfogénicas se verán afectadas (Kondamudi *et al.*, 2009). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue: establecer y regenerar plantas de *Dasyilirion acrotrichum* a partir de yemas laterales cultivadas *in vitro*, para su rescate y posterior conservación en la Mixteca Poblana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar donde se realizó el trabajo

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Programa Educativo de Agrobiotecnología de la Universidad Tecnológica de Izúcar de

Matamoros, ubicada en Prolongación Reforma No. 168 Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México.

### Material vegetal

Se recolectaron plantas de *Dasyilirion acrotrichum* (20 a 30 cm de longitud) en las comunidades de Tepexi de Rodríguez y Santa Inés Ahuatempan, Puebla, para realizar el establecimiento *in vitro* a partir de yemas laterales como explantes con 1 cm de longitud aproximadamente (Figura 2).



**Figura 2.** Plantas de *Dasyilirion acrotrichum* en comunidad con *Agave potatorum* Zucc y *Opuntia sp.*

### Establecimiento *in vitro* de yemas laterales de *Dasyilirion acrotrichum*

Se evaluaron dos protocolos para la desinfección de explantes y poder realizar el establecimiento *in vitro*. El primer protocolo consistió en lavar los explantes

con una solución detergente (Roma®) más tres gotas de Tween 20. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en etanol 70 % (v/v) durante 3 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se trasladaron a campana de flujo laminar para colocarse en hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) (aproximadamente 0.7 % de cloro activo) durante 10 minutos, según el protocolo sugerido por Asma *et al.* (2008). Transcurrido el tiempo, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril con ácido cítrico (150 mg·L<sup>-1</sup>) y ácido ascórbico (100 mg·L<sup>-1</sup>) para poder ser sembrados en el medio de cultivo. El segundo protocolo fue similar al anterior, únicamente se varió la concentración de hipoclorito de sodio al 20 % (v/v) (aproximadamente 1.5 % de cloro activo). En ambos casos, se emplearon 100 explantes y se colocó uno por cada tubo de ensayo de 15x2.3 cm (KIMAX), considerando un tubo de ensayo como unidad experimental, los cuales contenían 10 mL de medio de cultivo MS (1962) adicionado con BAP 3.0 mg·L<sup>-1</sup>, agar 8 g·L<sup>-1</sup> (Reyes-Silva, *et al.*, 2013), tiamina 0.40 mg·L<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg·L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup> y pH de 5.7 ± 0.01, los cuales se taparon con tapas de aluminio y fueron esterilizados en una autoclave de vapor de agua tipo horizontal a 121 °C y a una presión de 1.5 kg·cm<sup>-2</sup> durante 25

minutos (Aguilar *et al.*, 2018a; Aguilar y Rodríguez, 2018b). Finalmente, los tubos de ensayo se mantuvieron a 28 ± 2 °C con 16 horas (h) de luz y 8 h de obscuridad en el área de incubación por un periodo de 8 semanas para evaluar porcentaje de explantes no contaminados por microorganismos, explantes fenolizados y explantes con respuesta morfológica.

### **Efecto de BAP en yemas laterales de *Dasylium acrotrichum in vitro***

Se emplearon brotes obtenidos con el segundo protocolo de desinfección, ya que fue el que favoreció mayor número de explantes establecidos, los cuales se colocaron en un medio MS (1962) al 100 % de su concentración, enriquecido con mio-inositol 100 mg·L<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 0.4 mg·L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup> y adicionando diferentes concentraciones de N-6-Bencilaminopurina (BAP) (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg·L<sup>-1</sup>), más 8 g·L<sup>-1</sup> de agar y ajustando la solución final de los tratamientos a un pH de 5.7 ± 0.01 para ser esterilizados en autoclave. Los brotes *in vitro* de *D. acrotrichum* con 1 cm aproximadamente de longitud, se separaron con ayuda de material de disección estéril y se sembró uno por cada tubo de ensayo, siendo cinco repeticiones por tratamiento y considerando un tubo de ensayo como unidad experimental. Los cultivos *in vitro*

se colocaron en el área de incubación durante ocho semanas en condiciones de 16 h luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C para evaluar número y longitud de brotes y de raíz, presencia o ausencia de callo y necrosis.

### **Análisis estadístico**

Se obtuvieron porcentajes de respuestas en las variables para determinar el mejor protocolo de desinfección de explantes de *D. acrotrichum*; y se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey ( $p=0.05$ ) para determinar el efecto medio de los tratamientos para diferentes concentraciones de BAP. El paquete estadístico empleado fue Minitab 17.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Establecimiento *in vitro* de yemas laterales de *Dasyliirion acrotrichum***

Estos resultados coinciden con Kondamundi *et al.* (2009) sobre la importancia de contar con un protocolo de desinfección eficiente, de lo contrario, la presencia de microorganismos y/o daños en los tejidos, evitan continuar con la manipulación celular *in vitro* para la obtención de respuestas morfogénicas, truncando así, la continuidad de este tipo de proyectos. Sin embargo, de los resultados obtenidos del protocolo de desinfección con 10 % (v/v) de hipoclorito de sodio, sólo el

22 % de explantes se establecieron *in vitro*, la mayoría presentaron contaminación microbiana. Se observó en el medio de cultivo, la presencia de hongos filamentosos con micelio de color blanco y anaranjado o rojizo, y en otros explantes, se observaron colonias bacterianas. El mismo tipo de microorganismos se observaron en los explantes tratados con hipoclorito 20 % (v/v), sin embargo, aumentar la concentración de hipoclorito de sodio mejoró la obtención de explantes no contaminados (87 %); no obstante, también se vio afectada de forma negativa la liberación de sustancias fenólicas en el medio de cultivo, lo cual, pudo influir en el porcentaje de explantes con respuestas morfogénicas (Tabla 1). Posiblemente, esto se deba al efecto fitotóxico que tiene el hipoclorito de sodio, el cual es más notorio a partir de la concentración de 2 % (Ramírez *et al.* (2002). A pesar que en *Dasyliirion acrotrichum* se empleó una concentración de 1.5 % aproximadamente de cloro activo, los resultados sugieren que el efecto fitotóxico del hipoclorito de sodio, va a variar dependiendo de la especie vegetal trabajada, no obstante, la concentración recomendada es entre 1.5 a 2 %, También, estos resultados coinciden con lo reportado por Borges-García *et al.* (2009) en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L., quienes

obtuvieron mayor porcentaje de explantes establecidos con 1.5 % de hipoclorito de sodio, pero en un tiempo de inmersión de 30 minutos. Los mismos autores reportan que el porcentaje de explantes contaminados disminuyó cuando se aumentó la

concentración de hipoclorito de sodio, no obstante, el porcentaje de establecimientos también fue menor y aumentó el porcentaje de tejidos necrosados y muerte de los mismos

**Tabla 1.** Efecto de los protocolos de desinfección de explantes de *Dasyliirion acrotrichum* para su establecimiento *in vitro*.

Protocolo de desinfección	Explantes no contaminados (%)	Explantes con fenolización (%)	Explantes con respuesta morfogénica (%)
Hipoclorito de sodio al 10 % (v/v)	22	13.63	86.36
Hipoclorito de sodio al 20 % (v/v)	87	82.76	67.81

**Nota:** El porcentaje de explantes fenolizados y con respuesta morfogénica, se calculó con base al porcentaje de explantes no contaminados.

Por otra parte, la respuesta morfogénica (formación de brotes por explante) en *Dasyliirion acrotrichum* es similar (3.3 brotes) a la obtenida en *Dasyliirion lucidum* y superada con 10.3, 5.3 y 5.3 brotes por explante en *Dasyliirion leiophyllum*, *Dasyliirion longissimum* y *Dasyliirion serratifolium*, respectivamente con BAP 3 mg·L<sup>-1</sup> (Reyes-Silva *et al.*, 2013). Sin embargo, ellos emplearon semillas como explantes y no obtuvieron brotes hasta después de realizar el subcultivo de las plántulas obtenidas, lo cual conlleva, mínimo 60 días más de espera para obtener brotes nuevos.

### Efecto de BAP en yemas laterales de *Dasyliirion acrotrichum in vitro*

Los resultados obtenidos para formación de brotes (6.8 brotes por explante), son similares a lo reportado por Reyes-Silva *et al.* (2013) en *Dasyliirion leiophyllum* y *Dasyliirion longissimum* (6.7 y 6.2 brotes por explante, respectivamente) cuando se emplea 1 mg·L<sup>-1</sup> de 6-Benciladenina (BA), no obstante, son superiores a los obtenidos en *Dasyliirion lucidum* y *Dasyliirion serratifolium* (2.7 y 2.3 brotes por explante, respectivamente) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP en la obtención de respuestas morfogénicas a partir de yemas laterales de *Dasyilirion acrotrichum* *in vitro*.

Tratamiento	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
MS + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> BAP	2.5 ± 0.55 c	1.9 ± 0.20 a
MS + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP	6.8 ± 0.84 a	1.78 ± 0.22 a
MS + 2.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP	4.8 ± 0.84 b	0.52 ± 0.15 c
MS + 3.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP	3.2 ± 0.84 c	0.88 ± 0.23 b
MS + 5.0 mg·L <sup>-1</sup> BAP	3.0 ± 0.70 c	0.40 ± 0.10 c

**Nota:** los valores representan la media ± desviación estándar. Las medias con letras diferentes dentro de una columna fueron significativamente diferentes (Tukey, p=0.05).

También, en el mismo trabajo de Reyes-Silva *et al.* (2013), se puede apreciar que el número de brotes formados en *Dasyilirion lucidum* y *Dasyilirion serratifolium*, aumenta de forma directamente proporcional al incrementar la concentración de BA, respuesta que no coincide con los resultados obtenidos en *Dasyilirion acrotrichum*. Sin embargo, en *Dasyilirion acrotrichum* la respuesta es similar como en las especies de *Dasyilirion leiophyllum* y *Dasyilirion longissimum*, es decir, no parece mostrar

algún comportamiento logarítmico para la formación de brotes (Tabla 2), al contrario, a partir de 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP hubo presencia de callo color blanco y de textura homogénea en la base de los brotes formados, aumentando dicha respuesta con 3.0 y 5.0 mg·L<sup>-1</sup> y disminuyendo la diferenciación celular (Figura 3). Estos resultados no coinciden con los informados por Arce-Montoya *et al.* (2006) y con Reyes-Silva *et al.* (2013) referentes a la formación de callo en otras especies de *Dasyilirion*, a pesar de emplear concentraciones más elevadas de BA.



**Figura 3.** Formación de brotes en *Dasyilirion acrotrichum* a partir de yemas laterales cultivadas *in vitro*. Respuesta en cuatro semanas (A, B y C) con 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. Respuesta en ocho semanas (D, E y F) con 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente.

Por otra parte, Osorio-Rosales y Mata-Rosas (2005), estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de BA en la formación de brotes en explantes basales

de *Beaucarnea gracilis* y *Beaucarnea recurvata* (nolináceas). Encontrando que, para *Beaucarnea gracilis*, el mayor número de brotes formados (5.4 brotes por explante) fue con  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, y para *Beaucarnea recurvata* obtuvieron 1.9 brotes por explante con  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Otros autores, como Aguilar y Rodríguez (2018b), reportan el empleo de BAP para obtener respuestas similares en la formación de brotes en *Agave marmorata* Roetzl; sin embargo, también mencionan que la presencia de auxinas como ácido indol-3-acético (AIA) juega un papel importante en la diferenciación celular para la formación y longitud de brotes, variable a considerarse para futuros estudios con *Dasyllirion acrotrichum*. No obstante, como se puede apreciar en la Tabla 2, el empleo de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP fue suficiente para favorecer la formación y longitud de brotes, con lo cual, se puede lograr una cantidad arriba de 90 mil plantas en un año a partir de un explante, respuesta que puede mejorarse como se observa en el trabajo de Aguilar y Rodríguez (2018b). Por ello, es fundamental realizar los protocolos de micropropagación correspondiente a cada especie y etapa de cultivo.

Además, estos resultados corroboran que las concentraciones más elevadas de BAP ( $2.0$ ,  $3.0$  y  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no sólo reducen la formación de brotes al aumentar la formación de callo, sino que el crecimiento de los brotes formados también se ve reducido (Tabla 2). Por otra parte, la formación de callo aumenta la probabilidad de causar variación somaclonal (Pierik, 1991), la cual puede ser de origen nuclear y/o citoplasmático (Larkin, 2004); situación que se pretende evitar para conservar dicho recurso fitogenético. Sin embargo, todo depende de la especie vegetal y del tipo de explante, en algunos casos, se han empleado concentraciones más elevadas de BA ( $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para obtener brotes de forma directa (Fernández *et al.*, 2020). No obstante, emplear mayor concentración de citocinina no está directamente relacionada con la obtención de mayor número de brotes, también se puede obtener un conjunto de células con crecimiento porco organizado u otro tipo de respuesta morfogénica (Aguilar y Rodríguez, 2018b), la cual, también depende del nivel endógeno de reguladores de crecimiento que tenga el explante. Por ello, el presente trabajo resulta trascendente ya que sienta las bases

científicas y tecnológicas para el establecimiento de una estrategia de propagación *in vitro* de cucharilla (*Dasyilirion acrotrichum*) con fines de restaurar su hábitat natural en un futuro, lo cual contribuiría a la preservación de recursos naturales con importancia en el mantenimiento de tradiciones culturales de la población y que son fuentes de empleo.

## CONCLUSIONES

Los protocolos de desinfección con el empleo de etanol 70 % (v/v) e hipoclorito de sodio al 10 y 20 % (v/v), respectivamente, permiten el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Dasyilirion acrotrichum* evitando la presencia de microorganismos en el medio de cultivo. El aumento de la concentración de hipoclorito de sodio, del 10 a 20 % (v/v), mejora la obtención del 22 al 87 %, respectivamente, de explantes de *Dasyilirion acrotrichum* no contaminados *in vitro*. Sin embargo, el aumento en la concentración de hipoclorito de sodio favorece la liberación de sustancias fenólicas en el medio de cultivo. El empleo de yemas axilares como explantes a partir de plantas recolectadas

en campo, y la adición de BAP ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en un medio de cultivo MS, permite la regeneración de plantas de *Dasyilirion acrotrichum* mediante organogénesis directa, lo cual contribuirá al diseño de estrategias para su propagación masiva por métodos biotecnológicos y a la preservación de esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Le expresamos nuestra más sincera gratitud al H. Ayuntamiento de Izúcar de Matamoros, Puebla, 2014-2018, por el apoyo brindado para llevar a cabo éste trabajo de forma conjunta mediante un convenio de colaboración con la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros (UTIM).

## REFERENCIAS

- Aguilar, D., Rodríguez, J. y Herrera, H. (2018a). Obtención de brotes *in vitro* en *Agave potatorum* Zucc. Universo de la Tecnológica. 10(2): 5-7.
- Aguilar, D. y Rodríguez, L. (2018b). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca poblana. Revista Colombiana de Biotecnología. 20(2): 124-131; doi:

- 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.7708  
4.
- Arce-Montoya, M., Rodríguez, A. M., Hernández, G. J., Robert, M. L. (2006). Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant Cell Reports*. 25: 777-783; doi: 10.1007/s00299-006-0144-3.
- Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. H. y Arroyo-Martínez, H. A. (2019). *Apuntes de genética vegetal*, México, Universidad Autónoma del Estado de México. ISBN: 978-607-633-073-9.
- Arzate-Fernández, A. M., Martínez-Velasco, I., Álvarez-Aragón, C., Martínez-Martínez, S. Y. and Norman-Mondragón, T. H. (2020). Respuesta morfogénica de dos especies de *Agave* regeneradas *in vitro*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 23(47). ISSN: 1870-0462.
- Asma, N., Kashif, A., Saifullah, K. (2008). *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*). *Pakistan Journal of Botany*. 40(1): 99-104.
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G. e Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 38 (2): 165 – 171.
- Borges-García, M., Estrada-Abeal, E., Pérez-Rodríguez, I. y Meneses-Rodríguez, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2): 127-135.
- Bravo-Hollis, H. (1978). Las cactáceas de México. Vol 1, 2ª. ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Fufa, H., Tesema, M. and Daksa, J. (2019). *In vitro* regeneration protocol through direct organogenesis for *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*) accessions in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*. 18(31): 991-1003; doi: 10.5897/AJB2019.16914.
- Kondamudi, R., Sri-Rma, M. K., Pullaiah, T. (2009). *Euphorbiaceae* - a critical review on plant tissue culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(3): 313-335.
- Larkin, P. (2004). Somaclonal variation: Origin and causes. In: *Encyclopedia of plant and crop science*, edited by R.M. Goodman. pp: 1158–1161. New York: Marcel
- Mata-Labrada, F. (2007). The peculiar use of the leaves of *Dasyliirion*

- acrotriche* (Schiede) Zucc., in Central Veracruz. En *International Cactus Adventures*. 75: 24-19.
- Matthies, D., Bräuer, I., Maibom, W. & Tschardtke, T. (2004). Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105:481-488; doi: 10.1111/j.0030-1299.2004.12800.x.
- Melgoza, C. A. y Sierra, T. S. J. (2004). Contribución al conocimiento y distribución de las especies de *Dasyllirion spp.* (Sotol) en Chihuahua México. *Revista Ciencia Forestal en México*. 28(93): 25-40.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- Osorio-Rosales, M. L. y Mata-Rosas, M. (2005). Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *HortScience* 40: 1481-1484; doi: 10.21273/HORTSCI.40.5.1481.
- Pierik, R. L. M. (1991). Commercial aspects of micropropagation. In: Prakash, J., and R. L. M. Pierik (eds). *Horticulture — New Technologies and Applications*. Springer Netherlands. pp: 141-153.
- Probert, R. J., Daws, M. I. and Hay, F. R. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany*. 104:57-69; doi: 10.1093/aob/mcp082.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Atlahua-Temoxtle, J. y Bello-Bello, J. J. 2019. *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. *South African Journal of Botany* 121: 219–223; doi: org/10.1016/j.sajb.2018.11.010.
- Ramírez, M., Urdaneta, A., León de Sierralta, S. (2002). Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanabo (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 19 (1): 1-8.
- Reyes-Silva, A. I., Morales-Muñoz, C. F., Pérez-Reyes, M. E., Pérez-Molphe, B. E. (2013). Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia*. 21(58): 12-20.
- Rodríguez-De-la-O, J. L. y Pineda, F. E. (1985). Micropropagación de agaves (*Agave spp.*). En: *Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. Curso ONU-FAO-CP. (173 - 178). Chapingo, México: Chapingo.
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. 1a. Edición digital. Comisión

Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-59-ECOL-2001. Protección ambiental/ Especies nativas de México de flora y de fauna silvestres/ Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio/ Lista de especies en riesgo. México, D. F.: Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002, 2da. Sección.

Vega-Cruz, J., Melgoza-Castillo, A. & Sierra-Tristán, J. S. (2006). Caracterización del crecimiento de dos especies (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm. ex Trelease y *D. sereke* Bogler) fertilizadas con nitrógeno y fosforo. Revista Ciencia Forestal en México. 31(99): 55-71.