



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

MICROPROPAGACIÓN DE *Hymenocallis harrisiana* (Herb.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA:

MAYRA PAULINA FLORES ALCÁNTARA

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESORES DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

OCTUBRE, 2016



CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, PIEDRAS
BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos Específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Genero <i>Hymenocallis</i>	4
2.1.1. Origen y distribución.....	4
2.1.2. Descripción morfológica.....	4
2.1.3. Usos.....	5
2.1.4. Propagación.....	7
2.1.4.1. Semilla.....	7
2.1.4.2. Bulbo.....	8
2.2. <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.).....	8
2.2.1. Origen y distribución.....	8
2.2.2. Descripción morfológica.....	9
2.2.3. Usos.....	10

2.2.4. Propagación.....	10
2.3. Micropropagación.....	11
2.3.1. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	13
2.3.2. Micropropagación en bulbosas.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Ubicación del experimento.....	20
3.2. Obtención del material vegetal.....	20
3.3. Desinfestación de semillas.....	20
3.4. Extracción de embriones.....	21
3.5. Germinación de embriones para la obtención de explantes <i>in vitro</i>	21
3.6. Inducción de bulbillos.....	22
3.7. Enraizamiento de plántulas regeneradas.....	24
3.8. Aclimatación y transferencia a condiciones de invernadero.....	24
3.9. Variables a evaluar.....	25
3.10. Análisis histológico.....	25
3.11. Análisis estadístico.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Germinación de embriones.....	27
4.2. Inducción de bulbillos.....	31
4.3. Análisis estadístico.....	33
4.4. Porcentaje de enraizamiento de plantas regeneradas.....	34
4.5. Aclimatación y transferencia a condiciones de invernadero.....	34
V. CONCLUSIONES.....	35
VI. GLOSARIO.....	36
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos usados para la germinación de embriones de <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.).....	22
Cuadro 2. Tratamientos usados para la inducción de bulbillos a partir de secciones de hoja, secciones de escama, y callo, en <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.).....	23
Cuadro 3. Respuesta morfo genética de los embriones de <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.), a diversas concentraciones de AIB en combinación con TDZ, en condiciones de oscuridad, después de 30 DDIC.....	30
Cuadro 4. Análisis de varianza para la inducción de bulbillos en <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.), a partir de secciones de escamas de bulbo, callo y hoja, a los 120 DDIC.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especies de <i>Hymenocallis</i>	5
Figura 2. <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.) en estado silvestre, Ocoyoacac, Estado de México.....	10
Figura 3. Micropropagación de <i>Hymenocallis harrisiana</i> (Herb.).....	29

RESUMEN

MICROPROPAGACIÓN DE *Hymenocallis harrisiana* (Herb.)

Mayra Paulina Flores-Alcántara*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura.

Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Director de Tesis: José Luis Piña¹, Amaury Martín Arzate-Fernández².

*Autor para correspondencia: paulinaflores_79@hotmail.com

^{1,2} Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5 Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Correspondencia: jlpinas@uaemex.mx, amaury1963@yahoo.com.mx

Hymenocallis harrisiana (Herb.) pertenece a la familia *Amaryllidaceae*. Se conoce como lirio araña, y es nativa de México. A pesar de tener gran potencial ornamental, por sus características llamativas de su flor, no hay estudios sobre su micropropagación que contribuyan a su mejoramiento genético. El objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo de micropropagación para *H. harrisiana* (Herb.), en el cual, se evaluó el efecto del ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) solos, o en combinación con tiazuron (TDZ), en la germinación de embriones, así como en la inducción de bulbillos a partir de secciones de escamas de bulbo, explantes de hoja y callos, obtenidos a partir de plántulas *in vitro*. Los resultados mostraron que en las concentraciones de 0.5-1.0 mg L⁻¹ de AIB + 0.5-1.0 mg L⁻¹ de TDZ, respectivamente fue posible obtener una germinación del 100%. Para la inducción de bulbillos, las secciones de escamas de bulbo fueron el mejor tipo de explante, obteniendo en promedio 4.87 ± 2.62 bulbillos, en el tratamiento con 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 1.0 mg L⁻¹ de TDZ. La adición de ANA en la etapa de enraizamiento favoreció el desarrollo de raíces sanas y de buena longitud. El estudio histológico confirmó que las estructuras formadas fueron bulbillos. Después de 60 días, las plántulas aclimatadas a condiciones de invernadero mostraron más

del 100% de adaptación. El protocolo desarrollado podría ser el punto de partida para desarrollar futuras estrategias de conservación y de mejoramiento genético de la especie.

Palabras clave: *Hymenocallis harrisiana* (Herb.), micropropagación, ácido indolbutírico (AIB), tidiazuron (TDZ), ácido naftalenacético (ANA).

ABSTRACT

Hymenocallis harrisiana (Herb.) MICROPROPAGATION

Mayra Paulina Flores-Alcántara*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura.

Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Director de Tesis: José Luis Piña¹, Amaury Martín Arzate-Fernández².

*Autor para correspondencia: paulinaflores_79@hotmail.com

^{1, 2} Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5 Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Correspondencia: jlpinas@uaemex.mx, amaury1963@yahoo.com.mx

Hymenocallis harrisiana (Herb.) belongs to the *Amaryllidaceae* family. It is known as spider lily, and is native to Mexico. Despite having great ornamental potential, for its beautiful flowers any studies of its micropropagation will contribute to its genetic improvement. The goal of this study is to establish a micropropagation protocol for *H. harrisiana* (Herb.), where the effect of indolebutyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA) alone, or in combination with thidiazuron (TDZ), was evaluated on the germination of embryos, as well as induction of bulblets from bulb flake sections, leaf explants and callus, plantlets obtained from *in vitro*. The results showed that concentrations of 0.5 - 1.0 mg L⁻¹ of IBA + 0.5 - 1.0 mg L⁻¹ TDZ, respectively is possible to obtain a germination of 100%. For induction of bulbils, sections of bulb scales were the best type of explant, gaining on average 4.87 ± 2.62 bulbils, treatment with 1.0 mg L⁻¹ of IBA + 1.0 mg L⁻¹ TDZ. The addition of NAA in the rooting stage favored the development of healthy roots and good length. The histological examination confirmed that the structures were formed bulbils. After 60 days, the seedlings acclimatized to greenhouse

conditions showed more than 100% of adaptation. The protocol developed could be the starting point for developing future conservation strategies and breeding of the species.

Keywords: *Hymenocallis harrisiana* (Herb.), micropropagation, indolebutyric acid (IBA), thidiazuron (TDZ), naphthalene acetic acid (NAA).

I. INTRODUCCIÓN

El género *Hymenocallis* Salisb., viene del griego y significa “hermosa membrana” aludiendo a la corona estaminal que caracteriza al género (Tapia-Campos *et al.*, 2012). Comúnmente conocida como lirio araña, se distribuye en zonas templadas y tropicales desde el sureste y centro de los Estados Unidos de América, el Caribe, México, Centroamérica y noreste de Sudamérica, presentando su mayor riqueza en Mesoamérica (García-Mendoza 2010).

Nuestro país posee el mayor número de especies (30) de este género (Rodríguez *et al.*, 2013), la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO 2009), señala que muchas de ellas son endémicas y en algunos casos son consideradas maleza. Aun así, en algunas partes se cultivan en jardines y parques por la belleza y fragancia de su flor (López y Espejo 2002).

Hymenocallis harrisiana (Herb.), es nativa de México. En estados como Sinaloa, Nayarit y Jalisco se cultiva como planta ornamental, mientras que de manera silvestre, es una planta más bien escasa, con poblaciones pequeñas y muy localizadas, cuya floración se presenta de mayo a julio (CONABIO 2009).

En nuestro país, desde el 2008 el género es considerado un recurso fitogénético con valor real y con potencial ornamental. En la actualidad, la red *Hymenocallis* del SINAREFI (Sistema Nacional de Recursos Fitogénéticos), cuenta con tres proyectos vigentes que contemplan: a) la validación de recursos genéticos de *Hymenocallis*, b) un programa de mejoramiento genético a corto, mediano y largo plazo, y c) la validación de recursos genéticos de *Hymenocallis* en Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Estado de México y Morelos.

Por lo anterior, se requieren establecer protocolos de multiplicación masiva de las especies del citado género. Las especies se propagan de manera asexual llegando a producir de seis a ocho bulbillos por bulbo, mientras que de forma sexual, una planta puede llegar a producir 200 semillas aunque no todas germinan, además de que el período de germinación tarda de uno a cuatro meses dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la semilla.

Una alternativa de propagación a gran escala, es el cultivo de tejidos vegetales, el cual permite establecer en condiciones asépticas, estructuras vegetales (células, órganos y tejidos) en medios de cultivo definidos, bajo condiciones de incubación controladas (Mendoza 2007).

En la literatura son escasos los trabajos de micropropagación en el género. Yanagawa e Ito (1988) reportaron que al utilizar escamas de bulbos con parte del disco basal, y cultivándolas en el medio semi-sólido de White (1943) suplementado con 0.01 mg L^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) y 5 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina (BA), pudieron regenerar de tres a cuatro bulbillos en *Hymenocallis speciosa*.

Así, resulta interesante el desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de *H. harrisiana* (Herb.) que contribuya a su rápida multiplicación y al mismo tiempo, facilite el diseño de futuras estrategias de mejoramiento genético de esta y otras especies del género.

1.1. Objetivo general

Establecer un protocolo de micropropagación para *H. harrisiana* (Herb.).

1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del ácido indolbutírico (AIB) y su combinación con tiazuron (TDZ), en la germinación de embriones de *H. harrisiana* (Herb.).
- Evaluar el efecto del AIB, y su combinación con TDZ, en la inducción de bulbillos, a partir de secciones de escamas de bulbo, y explantes de hoja y callo obtenidos a partir de plántulas *in vitro* en *H. harrisiana* (Herb.).
- Evaluar el efecto del ácido naftalenacético (ANA), en el enraizamiento de las plantas regeneradas a partir de bulbillos.
- Lograr la aclimatación de las plantas regeneradas.

1.3. Hipótesis

La adición de hormonas vegetales solas o en combinación favorece la micropropagación de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Genero *Hymenocallis*

2.1.1. Origen y distribución

El género *Hymenocallis*, es considerado como exclusivo del continente americano, agrupando aproximadamente 82 especies de plantas perenes y bulbosas. La mayoría de los autores coinciden que este género es nativo de México, con base a la gran diversidad de especies colectadas y que han sido descritas (Vega *et al.*, 1996). En nuestro país se reportan alrededor de 30 especies.

Las especies de *Hymenocallis* crecen en un gran número de hábitats de México, desde el nivel del mar hasta los 2400 msnm. Se distribuyen en estados como Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tamaulipas, Sonora, Jalisco, Tabasco y Yucatán, desarrollándose en diferentes tipos de vegetación desde selva baja caducifolia y subcaducifolia con vegetación riparia y zonas inundables, o en vegetación de dunas costeras en Veracruz (López-Ferrari 2002). Particularmente, *Hymenocallis harrisiana* (Herb.), se puede encontrar en vegetación de bosque de pino-encino en el Estado de Mexico (CONABIO 2009).

2.1.2. Descripción morfológica

Hymenocallis spp. es una planta geófito, herbácea, perenne o caducifolia; el rasgo más sobresaliente es la morfología de la corona estaminal de las flores, con los estambres unidos en una corona distintiva, los tépalos largos y estrechos que les dan su aspecto característico de una araña, algunos con una fragancia muy agradable. Poseen un bulbo cubierto por una túnica, de la que emergen las raíces blanquecinas gruesas, el escapo floral

y una roseta de hojas; el número de hojas es variable, son de color verde, el ancho varía de 2.3 a 4.5 cm y 15 a 45 cm de ancho, pueden ser pecioladas o lanceoladas.

El crecimiento de las especies de este género está relacionado con los ambientes donde se desarrollan, ya sean ambientes boscosos, selva nublada, etc. (Raymúndez *et al.*, 2005). El follaje persiste en algunas especies, mientras que en otras es estacional y lo pierden durante el período de sequía. Muchas especies de *Hymenocallis* son muy raras en la naturaleza, tienen una distribución muy restringida o son endémicas de una sola localidad (CONABIO 2009).



Figura 1. Especies de *Hymenocallis*. A. *Hymenocallis littoralis* Salisb., de uso comercial. B. *Hymenocallis rotata* en su hábitat natural.

2.1.3. Usos

Algunas especies de *Hymenocallis* son usadas como plantas ornamentales, en algunos viveros especializados. En diferentes países, se venden especies como *H. littoralis* Salisb., *H. rotata* (Ker Gawler) Herb. (Figura 1), *H. caribbaeae* Herb. y *H. tenuiflora* Herb. (Ogden 2007; Tapia-Campos *et al.*, 2012).

En México, especies como *H. leavenworthii* (Standl. & Steyerm) Bauml, *H. proterantha* Bauml, y *H. harrisiana* (Herb.), sólo se establecen en huertos familiares y algunas zonas abiertas (Borys *et al.*, 2005; Tapia-Campos *et al.*, 2012).

Algunas especies tienen efecto medicinal, por ejemplo, en el Salvador, los bulbillos de *Hymenocallis americana* son triturados y se usan para tratar las venas varicosas, úlceras e inflamaciones. En Perú, *Hymenocallis amancaes* (R. & P.) tiene uso medicinal para el tratamiento de contusiones y músculos desgarrados, también se utiliza como ornamental y es el símbolo de la ciudad capital de Lima, aunque se considera en peligro de extinción. En Venezuela y las Antillas se utilizan para los tumores, en Costa Rica, se utiliza el bulbo de *H. littoralis* como emético para controlar problemas intestinales (Ocampo y Balick 2009).

También se sabe que el extracto de las raíces y flores de *H. littoralis*, tiene propiedades contra *Candida albicans* (Sundarasekar *et al.*, 2012). Se ha demostrado que esta misma especie contiene varios alcaloides con propiedades medicinales que pueden ser aislados del bulbo, por ejemplo la licorina, que ha demostrado tener efectos antineoplásicos y antivirales (Ioset *et al.*, 2001; Sundarasekar *et al.*, 2012). Otro compuesto es la pancratistatina, eficaz contra el melanoma, cáncer en el cerebro, colon, pulmón y cáncer renal (Backhaus *et al.*, 1992; Pettit *et al.*, 1993; Sundarasekar *et al.*, 2012). El littoraline también es un alcaloide con actividad inhibidora sobre la transcriptasa inversa del VIH (Lin *et al.*, 1995; Sundarasekar *et al.*, 2012). Así mismo, Berkov *et al.* (2009) mencionan que en el género *Hymenocallis* hay presencia de galantamina, un alcaloide que actualmente se comercializa para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer (Pigni 2013).

2.1.4. Propagación

2.1.4.1. Semilla

Hay poca información con respecto a la capacidad reproductiva del género. Se propaga principalmente por semillas producidas por autopolinización. Hay dos grupos de *Hymenocallis* que pueden ser identificados por su ecología; xerófitos y mesohidrófitos. En ambos grupos, la semilla carece de latencia.

El grupo xerófito (hojas caducas) es poliembriogénico, sus semillas muestran una aparición secuencial de raíces embriogénicas seguidas de una rápida formación de pequeños bulbillos sin hojas y con raíces, que se ven obligados por las raíces contráctiles a entrar en un período de latencia de profundidad en las capas del suelo. Durante la siguiente temporada de lluvias los bulbillos forman raíces alimentadoras y hojas primarias. El grupo mesohidrófito es de hoja perenne y sus semillas producen una sola raíz embriogénica, que termina en un bulbo frondoso que tiene crecimiento continuo y arraigado (Tapia-Campos *et al.*, 2012).

De forma natural las semillas maduras caen en la superficie por debajo de las plantas madre, *Hymenocallis* spp. cuenta con un escapo por bulbo que llega a tener de 8 a 20 flores, y cada flor cuenta con 3 lóculos o cavidades, las cuales pueden contener hasta siete semillas, esto hace evidente que cada planta emita más de 200 semillas (Vega 1996). A pesar de ello, no todas pueden germinar o llegar a una planta adulta por las condiciones en las que se pueden encontrar.

Algunos horticultores mencionan que en la jardinería convencional usando variedades comerciales como son *H. liriosme*, *H. coronaria*, *H. crassifolia*, etc., la germinación

puede tomar hasta tres o cuatro meses y muy pocas llegan a crecer cuando falta agua en el suelo, reportándose que es preferible sembrar a principios de la primavera, ya que las semillas germinan en un mes (pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Hymenocallis).

2.1.4.2. Bulbo

El género *Hymenocallis* Salisb. se propaga mediante la división de bulbillos desarrollados entre las escamas o en el plato basal del bulbo. Los bulbillos crecen en diferentes posiciones ya sea entre escamas o en la parte superior de los restos del plato basal, en este último caso la parte central es eliminada para evitar la reaparición de los meristemas dominantes y los bulbillos se separaran cuando la placa basal se descomponen; ambos métodos generan bulbillos de número variable y tamaño según la escala o el bulbo (Tapia-Campos *et al.*, 2012).

En la actualidad existen variedades comerciales de este género como *H. caribaea*, *H. littoralis*, *H. speciosa*, *H. festalis*, *H. narcissiflora* y *H. macrostephana*, (intergardening.com/a-z-plants/garden-plants-h/hymenocallis.html).

2.2. *Hymenocallis harrisiana* (Herb.)

2.2.1. Origen y distribución

Esta especie es nativa de México, se distribuye en el centro y sur de nuestro país. Aunque la CONABIO (2009) la considera una maleza, se ha registrado que en el Valle de México, y en estados como Sinaloa, Nayarit, y Jalisco, se cultiva como planta ornamental, mientras que de forma silvestre es una planta más bien escasa, con poblaciones pequeñas y muy

localizadas, creciendo en manchones, su distribución por tipo de zona bioclimática es el bosque de pino-encino. Su floración se presenta de mayo a julio.

2.2.2. Descripción morfológica

Es una hierba perenne, con bulbos: (2.5-) 3-4.3 (-5.5) cm largo, 2-2.7 (-4.6) cm ancho, elíptico a globoso tunicado; número de hojas: 3-4(-8); hojas: 15-45 cm largo, 2.3-4.5 cm ancho, oblongas a elípticas, basales, arrosetadas, angostas hacia la base, pseudopeciolas, erectas; color de hojas: verde brillante a algo glauco; escapo: 35-65 cm largo (tallo sin hojas que nace directamente del bulbo y porta las flores) (Figura 2a), es umbeliforme; flores: bisexuales; número de flores: 3-4(-6); tépalos: 6.5-7.5 cm largo, 4-7 mm ancho; tubo: 10-18.5 cm largo, verde en la base, blanco en la porción superior, ascendente; simetría radial, perianto recto o curvado, en su ápice presenta 6 lóbulos curvados hacia atrás (dirigidos hacia abajo), lineares a linear-lanceolados, de 6.5 a 7.5 cm de largo y 4 a 7 mm de ancho, con ápices agudos; estambres 6, unidos por sus bases formando no un tubo sino una especie de copa llamada corona estaminal: 2-2.5 cm alto, 2-2.5 cm diámetro, infundibuliforme a subrotada, margen con o sin dienteillos, blanca; porción libre de los filamentos: 5.5-6.5 cm largo; ovario ínfero, trilocular, con 2 óvulos por lóculo, el estilo filiforme, generalmente sobrepasando a los estambres, estigma pequeño, capitado (Figura 2b); semillas: 5-6 por fruto, 1.3-1.8 cm largo, 0.8-1.2 cm ancho, cilíndricas o aplanadas, a veces triquetras carnosas, verdes (Figura 2c) (García-Mendoza 2010).

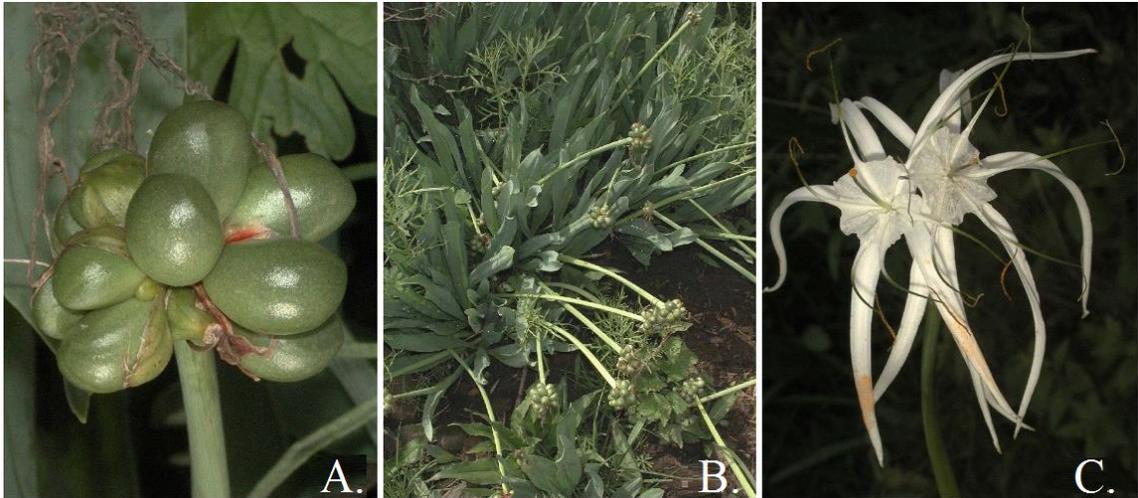


Figura 2. *Hymenocallis harrisiana* (Herb.) en estado silvestre, Ocoyoacac, Estado de México. **A.** Semillas triquetras carnosas. **B.** Hojas verdes poco glaucas arrosetadas, formación de semillas en los escapos florales. **C.** Flor de simetría radial con corona estaminal.

2.2.3. Usos

En el Valle de México y también fuera del país se cultiva como ornamental (CONABIO 2009), también se ha reportado el uso del bulbo triturado para aplicarlo como una mascarilla, para tratar manchas en la piel y otros males dérmicos (planetatepoztlan.mx/la-canada-de-san-geronimo-y-la-cebolla-de-monte/).

2.2.4. Propagación

Al ser una planta silvestre no se reportan tipos de propagación específicos para esta especie. Generalmente hay saqueo de estas plantas silvestres, recolectan los bulbos para trasplantarlos a pequeños jardines y en estos se desarrollan, generalmente la especie se propaga por división de bulbillos o bien por semilla la cual forma cae y forma pequeños bulbillos sin hojas con raíces, que permanecerán latentes en el suelo hasta la siguiente temporada de lluvias, en la que formaran más raíces hojas primarias.

2.3. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas (explantes), ya sean tejidos o células, los cuales son cultivados asépticamente en un tubo de ensaye o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones fisicoquímicas, nutricionales y ambientales (luz, temperatura y humedad). La propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos se basa en el principio de totipotencia: toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo (Sánchez 2002).

En las células vegetales cultivadas *in vitro*, los tejidos y cultivos de órganos no son totalmente autótrofos, por lo que se establece una necesidad de carbohidratos en medios de cultivo para mantener el potencial osmótico y servir como fuentes de energía y de carbono para los procesos de desarrollo (Chae 2013; Chandrasekhar *et al.*, 2015).

El objetivo de la micropropagación, es propagar clones que pueden ser derivados de cultivo de tejidos a partir de yemas de brotes o yemas primordiales (meristemas), o a través de la formación de embriones somáticos que se asemejan a los embriones de las semillas de plantas intactas (George *et al.*, 2008).

El proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano se denomina organogénesis (Calva - Calva 2005), la organogénesis indirecta es cuando los nuevos brotes son inducidos a partir de tejidos no organizados (callos) u organogénesis directa que comprende la formación de brotes adventicios o de raíz a partir de los explantes, sin la formación de callo (Pascual 2007).

George *et al.*, 2008, mencionan que la micropropagación está conformada por varias etapas, las cuales se describen a continuación:

Etapa 0: Selección de plantas madre y preparación. Antes de que comience la micropropagación, se debe prestar especial atención a la selección de las plantas madre. Deben ser típicas de la variedad o especie, y estar libre de cualquier síntoma de la enfermedad.

Etapa I: El establecimiento de un cultivo aséptico. Se requiere que los explantes sean transferidos al medio de cultivo adecuado, libre de contaminantes; seguido por algún tipo de crecimiento (por ejemplo, el crecimiento de una punta del brote, o la formación de callo).

Etapa II: La producción de propágulos adecuados. Producir nuevos propágulos que al separarlos del cultivo sean capaces de dar lugar a plantas completas. La multiplicación puede llevarse a cabo a partir de 3 enfoques; por crecimiento y proliferación de meristemas extirpados de brotes apicales y axilares de la planta madre, por inducción y multiplicación de meristemas adventicios a través de procesos de organogénesis o embriogénesis somática, o directamente en los explantes derivados de órganos, tejidos o células.

Etapa III: Preparación para el crecimiento en el medio natural. Los brotes o plántulas derivadas de la etapa II se desarrollan para que sean capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, y la supervivencia sin un suministro artificial de carbohidratos. Según lo propuesto originalmente por Murashige & Skoog (1962), la etapa III incluye el enraizamiento *in vitro* de brotes antes de su traslado al suelo. El enraizamiento de brotes

es una parte muy importante de cualquier esquema de propagación *in vitro*. Pocas especies forman raíces adventicias en los brotes durante la etapa III, pero por lo general es necesario utilizar medios especiales, o diferentes métodos, para inducir la formación de raíces.

Etapa IV: Transferencia al medio natural. Los métodos por los cuales las plántulas se transfieren desde el cultivo *in vitro* hacia el medio ambiente *ex vitro* son extremadamente importantes. Si no se lleva a cabo con cuidado, la transferencia puede resultar en una pérdida significativa del material reproducido.

En la práctica, las plántulas se retiran de sus envases en la etapa III, y si han sido cultivadas en medio con agar, el gel se lava cuidadosamente de las raíces. Las plántulas son trasplantadas en un medio adecuado de enraizamiento (mezcla de turba: composta de arena estéril) y se mantienen durante varios días en alta humedad reduciendo la intensidad de luz.

2.3.1. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias orgánicas producidas por la plantas que se encuentran a muy baja concentración, se sintetizan en determinado lugar de la planta y se translocan hacia otras partes de la misma (Lluna 2006); intervienen en la fisiología de la planta, modulando sus funciones, particularmente multiplicación y elongación de las células, la floración y el crecimiento (Bedoya y Ríos 2010).

Los productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las sustancias de crecimiento orgánicas, o compuestos que tienen una capacidad de modificar el crecimiento de plantas por algún otro medio, se denominan usualmente reguladores de

crecimiento vegetal (RCV). Algunas de las sustancias de crecimiento natural se preparan sintéticamente o por medio de procesos de fermentación y se pueden adquirir de proveedores de productos químicos.

Las sustancias que intervienen en la regulación del crecimiento de las plantas actúan en forma conjunta, jerárquica y coordinada. La interacción entre la hormona y el receptor genera una cascada de eventos, como la activación o desactivación de proteínas de la membrana celular, el movimiento de calcio, cloro o potasio a través de proteínas transportadoras específicas, y cambios en el potencial de membrana y el pH en el citoplasma, así como en el medio externo. Estos procesos conforman una red de mensajes secundarios que amplifican la señal recibida y provocan una respuesta específica (Arriata 2014). En general los reguladores se clasifican en cinco grupos: citoquininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Reyes 2014).

Las auxinas y citoquininas son con mucho, los más importantes para la regulación del crecimiento y la morfogénesis en cultivos de tejidos vegetales y de órganos; en estos grupos de fitohormonas, los reguladores sintéticos han sido descubiertos con una actividad biológica, que es igual o mayor que la de las sustancias naturales de crecimiento equivalentes (George *et al.*, 2008).

A nivel celular, las auxinas controlan los procesos básicos tales como el inicio de la división celular en los meristemas, lo que da lugar a la formación de tejido desorganizado, u órganos definidos (Friml, 2003; George *et al.*, 2008). Se emplean frecuentemente los análogos sintéticos del ácido indolacético (AIA), debido a que este es degradado fácilmente por la luz, los análogos más conocidos son: ácido naftalenacético (ANA), ácido

2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Bach & Sochacki 2012; Reyes 2014) y ácido indolbutírico (AIB); los cuales a altas concentraciones estimulan la formación de raíces adventicias y a bajas concentraciones los brotes adventicios, estimulan la división celular, promueven la formación de callos, e inhiben el desarrollo de yemas axilares y el crecimiento de la raíz (Bedoya y Ríos 2010; González 2001).

Las citoquininas son derivados de purinas o urea y estimulan la división celular, las más conocidas son: 6-bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), zeatina (ZEA), isopenteniladenina (2iP) y tidiazurón (TDZ); en cultivos celulares promueven la división y proliferación celular, inducen la formación de brotes en los explantes y participan en la diferenciación de los callos a brotes (Haberer y Kieber 2002; Hwan *et al.*, 2012; García 2013).

Altas concentraciones de citoquinina (0.5 a 10 mg L⁻¹) generalmente inhiben la formación de raíces o retardan el crecimiento (Schraudolf y Reinert 1959; Harris y Hart 1964; Ben-Jaacov *et al.*, 1991).

El efecto de las citoquininas en cultivos de tejidos o de órganos puede variar según el compuesto particular utilizado, el tipo de cultivo, la variedad de planta de la que se derivó y si el explante se deriva de tejido juvenil o maduro (George *et al.*, 2008).

2.3.2. Micropropagación en bulbosas

Existen diversas técnicas empleadas para la micropropagación *in vitro* de plantas geófitas, en diversas especies se ha reportado el uso de bulbos como explantes (Hussey 1982;

Ferrando 2002; Mirici *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006; Kohut *et al.*, 2007; Yuliyana *et al.*, 2008; Bedoya y Ríos 2010; Nasircilar *et al.*, 2011; Ozel *et al.*, 2014; Reyes 2014).

La técnica más estudiada y usada es la de *escamas gemelas*, la cual consiste en seccionar el bulbo de tal forma que se obtengan dos escamas unidas a una porción de placa basal, lográndose obtener una gran cantidad de explantes por bulbo, generando de 20 a 45 bulbillos aproximadamente. A pesar de ser una técnica sencilla, los explantes obtenidos son pequeños y delicados, por lo cual se deben proteger de la desecación y la contaminación (Bach and Sochack 2012; Reyes 2014).

Se han utilizado otros órganos como las hojas (Nasircilar *et al.*, 2011; Kohut *et al.*, 2007; Husse 1982), y semillas inmaduras (Mirici *et al.*, 2005; Uzun *et al.*, 2014), sin embargo en la micropropagación de plantas geófitas es rara la utilización de este tipo de explantes. Por otro lado para especies endémicas y en peligro de extinción cualquier órgano regenerativo incluyendo embriones inmaduros pueden ser una fuente alternativa para su propagación y a la conservación de germoplasma de las especies.

También se han reportado estudios de embriogénesis somática con géneros como *Crinum x powellii* “album” (Bedoya y Ríos 2010), donde se logró la inducción y proliferación de callos friables en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), evaluando el efecto de 2,4-D, en combinación con diferentes concentraciones de 6-BAP y kinetina, el mayor número de embriones somáticos obtenidos fue de 129, los cuales se obtuvieron con 0.3 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ kinetina.

En *Zephyranthes carinata* se evaluó el crecimiento y desarrollo de los bulbillos utilizando el medio de cultivo MS y diferentes concentraciones de BAP y ANA; se encontró que en la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de BAP respondieron cinco de 16 explantes a los 55 días (Reyes 2014).

Ozel *et al.*, (2014), establecieron una estrategia eficiente de regeneración de bulbillos *in vitro* en *Muscari muscarimi* utilizando escamas de bulbo, el número máximo de bulbillos fue de 19, y se regeneraron en medio MS adicionado con 17.76 µM bencil amino purina (BAP) más 10.74 µM ANA.

Nasircilar *et al.*, (2011), al cultivar escamas de bulbo de *Muscari mirum* en medio de MS suplementado con 4 mg L⁻¹ 6-BAP y 0.25 mg L⁻¹ ANA obtuvieron un promedio de 23.50 bulbillos por explante, mientras que cuando cultivaron embriones inmaduros, sólo obtuvieron 9.23 bulbillos por explantes en medio MS adicionado con 2 mg L⁻¹ ANA y 0.5 mg L⁻¹ BAP, después de cinco meses de cultivo.

Para la propagación *in vitro* de *Sprekelia formosissima* Herbert., se utilizaron bulbillos *in vitro* como explantes y se cultivaron en medio MS con 2.5, 5, 10, 15 y 20 µM de BA combinado con AIB en una relación 10:1 (BA: AIB). Los mejores resultados se obtuvieron con BA 20 µM con 2.66 brotes por bulbillito (Cázarez *et al.*, 2010).

Durante el cultivo *in vitro* de *Lilium regale*, se indujo el mayor número de brotes al cultivar escamas de bulbos internas y externas en un medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ BA obteniendo un promedio de 12.6 brotes adventicios por explante (Lian *et al.*, 2009).

Vargas *et al.*, (2006) en *Hippeastrum*, probaron el efecto de BA (0.5, 1, 2, 3 mg L⁻¹) sola y combinada con 0.1 mg L⁻¹ de ANA en medio MS. El tratamiento adicionado con 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BA y el medio control resultaron ser los mejores tratamientos hacia la formación de brotes con un promedio de 3.65.

Ferrando (2002), manifestó que los explantes de escamas de bulbo en *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub., y *Rhodophiala rhodolirion*, presentaron un desarrollo inicial más vigoroso en medio MS adicionado con 3 mg L⁻¹ de BAP.

El uso de embriones inmaduros como explantes para la regeneración de bulbillos también ha sido reportado en *Sternbergia fischeriana*, obteniendo 81 bulbillos en medio MS suplementado con 0.25 mg L⁻¹ y 4 mg L⁻¹ de ANA (Mirici *et al.*, 2005). Resultados similares se reportaron con *Muscari muscarimi* Medik, en el cual se obtuvieron 59 bulbillos por explante en medio MS adicionado con 4 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ANA después de 1 año de inicio del cultivo (Uzun *et al.*, 2014).

En *Ismene amancaes* se menciona que utilizando medio MS, adicionando ANA y 6-BAP solas o en combinación, se pueden regenerar de tres a cuatro bulbillos a partir de secciones de escamas de bulbo (Pascual 2007).

En un estudio para propagar *Tigridia pavonia* se utilizó un medio de cultivo MS suplementado con citoquininas como TDZ, zeatina, kinetina y auxinas como IAA, ANA e AIB, individualmente o a diferentes concentraciones. El mayor número de brotes (6.4) se obtuvo en un medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ TDZ (Kumar *et al.*, 2012).

Respecto al género *Hymenocallis*, son escasos los trabajos de micropropagación. Yanagawa e Ito (1988), reportaron que utilizando secciones de escamas de bulbo con parte del disco basal, y cultivándolos en medio White (1943), suplementado con 0.01 mg L^{-1} de ANA y 5 mg L^{-1} de 6-BAP, pudieron regenerar de tres a cuatro bulbillos en *Hymenocallis speciosa*.

Así mismo, Yew *et al.*, (2010), evaluando el efecto de diferentes citocininas: 2iP (adenina 2-isopentenil), TDZ y Zeatina, respectivamente, a seis concentraciones diferentes (2.25, 4.50, 9.00, 13.50, 18.00, y $22.50 \mu\text{M}$), reportaron que 2iP a una concentración de $13,50 \mu\text{M}$ estimuló la mejor elongación de brotes en *Hymenocallis littoralis*, sin embargo, entre las tres citoquininas en las seis concentraciones ensayadas no hubo diferencia significativa en términos de multiplicación de brotes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF), de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

3.2. Obtención del material vegetal

Las semillas de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.) fueron colectadas en el municipio de Ocoyoacac, Estado de México, coordenadas: 19°16'45"N; 99°28'57.9"W, altitud; 2595 msnm.

3.3. Desinfestación de semillas

Las semillas se colocaron en una solución de fungicida y bactericida (1:1) por 30 minutos en agitación continua, posteriormente se lavaron con jabón líquido (Dial®) y agua corriente por 10 minutos. Más tarde, en condiciones asépticas, las semillas se colocaron en hipoclorito de calcio al 5% durante 10 minutos, se transfirieron a cloro comercial (Cloralex®) al 2.5% por 15 minutos, después se colocaron en etanol al 70% por un minuto, seguido de dos enjuagues con agua destilada esterilizada, y finalmente se mantuvieron en un tercer frasco con agua destilada esterilizada hasta su uso.

3.4. Extracción de embriones

En condiciones asépticas, las semillas ya desinfectadas se colocaron en una caja Petri y con el uso de un microscopio estereoscópico, se realizó un corte a la mitad de la semilla. Con ayuda de pinzas se extrajeron los embriones, que posteriormente fueron sembrados en frascos con medio de cultivo para su germinación.

3.5. Germinación de embriones para la obtención de explantes *in vitro*

Durante la etapa de germinación de embriones (E) para la obtención de explantes *in vitro* se utilizó un medio MS (Murashige y Skoog 1962) al 100% enriquecido con 30 o 60 g L⁻¹ de sacarosa, Fe-EDTA, 1 g L⁻¹ de carbón activado y 7 g L⁻¹ de agar. El pH del medio de cultivo se ajustó entre 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl antes de adicionar el agar, posteriormente se esterilizó con autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada frasco contenía 25 mL de medio de cultivo. Los tratamientos usados se muestran en la Cuadro 1.

Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por un frasco que contenía cuatro embriones, y cada embrión representó una unidad experimental, todos los tratamientos fueron incubados en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 días. Posteriormente se transfirieron a un fotoperíodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, con una intensidad lumínica de $126 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a los 60 días después de iniciado el cultivo (DDIC) se evaluó el porcentaje de embriones germinados.

Cuadro 1. Tratamientos usados para la germinación de embriones de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.).

Tratamiento	S (g L ⁻¹)	RCV (mg L ⁻¹)
Testigo	30	---
1	30	AIB 0.5 + TDZ 0.1
2	30	AIB 0.5 + TDZ 0.5
3	30	AIB 0.5 + TDZ 1.0
4	30	AIB 1.0 + TDZ 0.1
5	30	AIB 1.0 + TDZ 0.5
6	30	AIB 1.0 + TDZ 1.0
7	60	AIB 0.5 + TDZ 0.1
8	60	AIB 0.5 + TDZ 0.5
9	60	AIB 0.5 + TDZ 1.0
10	60	AIB 1.0 + TDZ 0.1
11	60	AIB 1.0 + TDZ 0.5
12	60	AIB 1.0 + TDZ 1.0

El tratamiento y el testigo contenía medio MS 100% y 1 g L⁻¹ de carbón activado

RCV: Reguladores de crecimiento vegetal

S: Sacarosa

3.6. Inducción de bulbillos

Para la inducción de bulbillos, se utilizaron tres tipos de explantes:

A) Secciones de hoja de plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de los embriones.

B) Secciones de escamas de bulbo.

C) Callos obtenidos en la etapa previa.

Los explantes utilizados tuvieron un tamaño promedio de 8 mm². Para evaluar la inducción de bulbillos por explante utilizando el AIB, ANA, y TDZ, solos o en

combinación, los explantes fueron colocados en medio MS al 100% enriquecido con 30 g L⁻¹ de sacarosa, Fe-EDTA, y 7 g L⁻¹ de agar. El pH del medio de cultivo se ajustó entre 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, antes de adicionar el agar, posteriormente se esterilizó con autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada frasco contenía 25 mL de medio de cultivo.

Es importante enfatizar que los tratamientos realizados en este experimento (Cuadro 2), se seleccionaron a partir de ensayos previos en embriones y secciones de escamas de bulbo, en los que se observó respuesta a la formación de brotes, por lo cual, las concentraciones de RCV no fueron iguales en cada uno de ellos.

Cuadro 2. Tratamientos usados para la inducción de bulbillos a partir de secciones de hoja, secciones de escamas de bulbo, y callo, en *Hymenocallis harrisiana* (Herb.).

Medio	Sacarosa (g L ⁻¹)	RCV (mg L ⁻¹)	CA (g L ⁻¹)
MS 100%	30	0.5 de AIB + 0.5 de TDZ	1.0
		1.0 de AIB + 1.0 de TDZ	1.0
		2.0 de ANA + 0.5de TDZ	1.0
		0.5 de ANA	1.0

RCV: Reguladores de crecimiento vegetal

CA: Carbón activado

Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por un frasco que contenía 4 explantes, y cada uno representó una unidad experimental. Todos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 25 ± 1°C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 126 μmol·m⁻²·s⁻¹. Después de 120 DDIC se determinó el número de bulbillos inducidos en cada tratamiento.

3.7. Enraizamiento de plántulas regeneradas

Las plántulas regeneradas fueron enraizadas en un medio MS al 50%, con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar, y 0.5 mg L⁻¹ de ANA, cada frasco contenía 25 mL. El pH se ajustó entre 5.7 ± 0.1 y se esterilizó con autoclave a 121°C.

Se hicieron seis repeticiones por tratamiento, cada repetición estuvo constituida por un frasco que contenía cuatro explantes, y cada explante se consideró una unidad experimental. Todos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 25 ± 1°C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, por 30 días, con una intensidad lumínica de 126 μmol·m⁻²·s⁻¹.

3.8. Aclimatación y transferencia a condiciones de invernadero

Las plantas enraizadas se enjuagaron con agua destilada esterilizada para retirar el agar, se colocaron sobre papel de estraza durante 12 horas para eliminar el exceso de agua en las raíces. Se utilizaron charolas de plástico con un sustrato esterilizado de tierra de monte cernida, tepojal, tezontle en proporción 1:1:1, se mantuvieron en incubación bajo luz continua y a una intensidad lumínica de 126 μmol·m⁻²·s⁻¹, a una temperatura de 25 ± 1°C; después de 30 días se transfirieron a macetas de 3 pulgadas en condiciones de invernadero por un mes, se regaron cada tercer día y se procedió a evaluar el porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatadas a condiciones de invernadero.

3.9. Variables a evaluar

Se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de germinación de embriones.
- Inducción de bulbillos por explante.
- Enraizamiento de las plantas regeneradas.
- Porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatadas a condiciones de invernadero.

3.10. Análisis histológico

Con la finalidad de determinar el origen celular de las estructuras obtenidas, se tomaron muestras de las mismas y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Instituto Nacional de Ecología (INECOL) ubicado en Xalapa, Veracruz. Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído (2.5%). Posteriormente, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizaron cortes longitudinales, los cuales fueron lavados en un buffer de fosfatos. La deshidratación se llevó a cabo en alcohol en orden ascendente (30%, 40% y 100%) por 50 minutos en cada uno de ellos, y enseguida se realizó un secado a punto crítico con CO₂ por una hora. El montaje de las muestras se realizó en una bomba de vacío, para recubrir las muestras con oro. Finalmente, el análisis de las muestras y la toma de fotografías se realizó con un microscopio electrónico de barrido JSM-6390 (Jeol™).

3.11. Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. La comparación de medias en los tratamientos se efectuó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$), mediante el programa estadístico Statgraphics® versión 5.0 para Windows ®.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Germinación de embriones

Se obtuvieron embriones de diferentes dimensiones (7 a 15 embriones por semilla), esto debido a que la especie es poliembriogénica (Figura 3a y 3b), lo cual coincide con lo mencionado por Borys *et al.*, (2005) quienes indican que en estado silvestre, en la especie se desarrollan de uno a siete plantas por semilla, dependiendo las condiciones hídricas en las que se encuentren.

La germinación de los embriones se observó a los 30 días después de iniciado el cultivo (DDIC), los explantes mostraron la formación de bulbillo y raíz de un color blanquecino. A los 60 DDIC, el color de los explantes se tornó de un color verde intenso (Figura 3 b y 3 c), el cambio de color pudo deberse a que los tejidos iniciaron la actividad fotosintética al ser transferidos a un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

En los tratamientos suplementados con AIB combinados con TDZ se obtuvo el 79 % de germinación a los 60 DDIC. Los tratamientos donde se observaron los valores más altos fueron el tratamiento 2 (0.5 mg L⁻¹ de AIB +0.5 mg L⁻¹ de TDZ adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa), y el tratamiento 12 (1.0 mg L⁻¹ de AIB +1.0 mg L⁻¹ de TDZ adicionado con 60 g L⁻¹ de sacarosa), en ambos se obtuvo el 100 %.

Se ha reportado que cuando la relación auxina/citoquinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995; Arratia, 2014). En función de esto, es posible que las concentraciones similares de ambos RCV hayan favorecido la germinación de los embriones en el presente estudio,

como también fue reportado por Panayotova *et al.*, (2008) en *Pancratium maritimum* al cultivar semillas maduras.

Por otro lado, George *et al.*, (2008) mencionan que la formación directa de brotes está acompañada por la proliferación de células desorganizadas, la cual es una masa muy compacta de los primordios de brotes que puede confundirse con callos. En el presente estudio, en siete de los tratamientos evaluados se observó la formación de callo friable, no embriogénico (Cuadro 3; Figura 3c y 3d). A pesar de ello, éste tipo de callo sólo se presentó en los embriones que al momento de la siembra sufrieron daño mecánico, lo cual coincide con lo mencionado por Hartmann y Kester (2001), quienes indican que un callo es una masa de tejido amorfa, que generalmente surge como resultado de la lesión de algún tejido o vegetal y en respuesta a hormonas.



Figura 3. Micropropagación de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.). A. Corte transversal de la semilla para la extracción de los embriones. (S) semilla; (E) embrión. B. Embriones extraídos de una semilla. C. Germinación a los 30 DDIC en el tratamiento 12 con 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 1.0 mg L⁻¹ de TDZ + 60 g L⁻¹ + 1 g L⁻¹ CA. (B) bulbo; (Ca) Callo. D. Desarrollo de bulbo y raíz a los 60 DDIC, en el tratamiento 5 con 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 0.5 mg L⁻¹ de TDZ + 30 g L⁻¹ + 1 g L⁻¹ CA. E. Formación de bulbillos adventicios en una sección de escama de bulbo cultivada en el tratamiento con 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 1.0 mg L⁻¹ de TDZ, 120 DDIC. (H) hoja; (Br) bulbillo. (Ex) explante. F. Desarrollo de bulbillos adventicios en una sección de callo cultivado en el tratamiento con 2.0 mg L⁻¹ de ANA + 0.5 mg L⁻¹ de TDZ. 120 DDIC. G. Desarrollo de bulbillos de 10-25mm de longitud a los 180 DDIC. H. Microfotografía de la formación directa de un bulbillo a los 180 DDIC. Barra = 2mm. I. Bulbillos enraizados a los 60 DDIC, en medio MS al 50%, con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar, adicionando 0.5 mg L⁻¹ de ANA. J. Bulbillos de 25 mm de longitud en adaptación *ex vitro*. K. Bulbos a los 30 días de transferirlos a condiciones de invernadero. L. Bulbos trasplantados a macetas de 3 a los 30 días de transferirlo a condiciones de invernadero.

Un efecto de los RCV utilizados durante la etapa de germinación *in vitro* fue la formación de brotes, la cual se presentó en 9 tratamientos y el testigo a pesar de que éste último no contenía hormonas, en el cual, los brotes fueron de color blanquecino formándose a partir del tejido calloso, o bien directamente del embrión. El mayor número de brotes se presentó en el tratamiento 8 (0.5 mg L⁻¹ de AIB y 0.5 mg L⁻¹ de TDZ suplementado como 60 gL⁻¹ de sacarosa) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Respuesta morfogénica de los embriones de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.), a diversas concentraciones de AIB en combinación con TDZ, en condiciones de oscuridad, después de 30 DDIC.

	Tratamientos			Germinación (%)	No. Callo formado	No. Brotes
	S (g L ⁻¹)	RCV (mg L ⁻¹)				
		AIB	TDZ			
Testigo	30	0.0	0.0	88.8	4	3
1	30	0.5	0.1	94.4	---	---
2	30	0.5	0.5	100.0	---	1
3	30	0.5	1.0	66.6	2	2
4	30	1.0	0.1	77.7	2	---
5	30	1.0	0.5	94.4	2	2
6	30	1.0	1.0	55.5	4	2
7	30	0.5	0.1	83.3	---	3
8	60	0.5	0.5	88.8	---	6
9	60	0.5	1.0	94.4	---	1
10	60	1.0	0.1	16.6	2	1
11	60	1.0	0.5	83.3	---	---
12	60	1.0	1.0	100.0	1	1

RCV: reguladores de crecimiento vegetal

S: sacarosa

Los brotes generados en ambas concentraciones de sacarosa no mostraron diferencias, ni problemas en su desarrollo. En contraste, Chandrasekhar *et al.*, (2015) reportaron que una

mayor concentración de sacarosa afectó el crecimiento de los brotes y el desarrollo de las plántulas en *Ceropegia ensifolia*. Esto comprueba que la exposición a hormonas y/o altas concentraciones de sacarosa puede ser diferente dependiendo de la especie evaluada.

Generalmente, en la micropropagación de plantas geófitas se utiliza como explante primario las escamas de bulbos, aunque estos a menudo se asocian con contaminación bacteriana y fúngica (Langens-Gerrits *et al.*, 1998; Mirici *et al.*, 2005). El uso de embriones presenta una mínima o nula contaminación, porque el material no está en contacto directo con el suelo o las condiciones ambientales.

4.2. Inducción de bulbillos por explante

En el presente estudio, la inducción directa de bulbillos se presentó a los 30 DDIC, observándose en un principio de dos a tres bulbillos y posteriormente una mayor proliferación de los mismos en los explantes.

Los mejores explantes para la inducción de bulbillos fueron el bulbo y el callo (Figura 3 ef), mientras que cuando se utilizaron secciones de hoja, se obtuvo un menor número de bulbillos lo cual pudo deberse a la madurez del explante, como también ha sido observado en *Sternbergia fischeriana* donde obtuvieron 81 bulbillos en medio MS suplementado con 4 mg L⁻¹ BA y 0.25 mg L⁻¹ ANA (Mirici *et al.*, 2005).

En estudios previos en el género *Hymenocallis* se han utilizado secciones de escamas de bulbo y como resultado solo han regenerado de tres a cuatro bulbillos, los estudios no difieren significativamente de otras especies de la familia *Amaryllidaceae* como el trabajo

de Pascual (2007) con *Ismene amancaes*, o el de Menzel (2009), en *Lillium spp.*, quien obtuvo un promedio de siete brotes por explante.

En el presente estudio, después de los 120 DDIC, el mayor número de bulbillos formador por explante (8), se observaron en el tratamiento con 1.0 mg L^{-1} de AIB + 1.0 mg L^{-1} de TDZ (Figura 3e). Así mismo, el número de bulbillos obtenidos en cualquiera de los tres explantes cultivados en medio MS en combinación de TDZ con AIB o ANA (Figura 3f) fue superior a lo reportado en *Ceropegia ensifolia* (Chandrasekhar *et al.*, 2015), quienes utilizando TDZ más BAP obtuvieron un máximo de cuatro bulbillos por explante.

Como se puede observar, los resultados pueden variar entre especies, debido a que la organogénesis depende, además de la relación citoquininas-auxinas y su concentración, de la edad fisiológica de la que procede el explante, la capacidad de respuesta del tejido a los RCV y a los cambios durante el cultivo (García 2013), como puede ser la producción intrínseca de fitohormonas.

Los bulbillos continuaron su desarrollo hasta la formación de una pequeña plántula (Figura 3g), las cuales posteriormente, fueron transferidas a un medio de cultivo MS al 50%, con 30 g L^{-1} de sacarosa, 7 g L^{-1} de agar, adicionando 0.5 mg L^{-1} de ANA, para favorecer su enraizamiento.

El estudio histológico mostró que el desarrollo de brotes era evidentemente la formación de bulbillos (Figura 3h) sobre el explante, y no de embriones somáticos, como otra vía de regeneración de la especie.

4.3. Análisis estadístico

El análisis de varianza mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas en el tipo de explante y los tratamientos respecto a la inducción de los bulbillos después de 120 DDIC (Cuadro 4). El análisis de comparación de medias entre los tres tipos de explantes, mostró que la mayor inducción de brotes se observó en el cultivo de secciones de escamas de bulbo, en la combinación de 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 1.0 mg L⁻¹ de TDZ (Cuadro 4).

El análisis de varianza mostró que el valor de “P” (95%) es mayor que la “F”, esto comprueba que hay diferencia estadística entre los tratamientos evaluados como se muestra en el Cuadro 4 por lo cual se realizó una prueba de comparación de medias, con lo cual se determinó que el mayor número de bulbillos por explante se obtuvo en el Tratamiento 2 con una media de 4.87 ± 2.62.

Cuadro 4. Análisis de varianza para la inducción de bulbillos en *Hymenocallis harrisiana* (Herb.), a partir de secciones de escamas de bulbo, callo y hoja, a los 120 DDIC.

RCV (mg L ⁻¹)	Escamas de bulbo*	EXPLANTES			
		F	Callo*	F	Hoja*
0.5 de AIB + 0.5 de TDZ	3.75 ± 2.90ab		1.31 ± 0.47 a		0.18 ± 0.75 a
1.0 de AIB + 1.0 de TDZ	4.87 ± 2.62 b		2.43 ± 2.55 b		0.5 ± 1.36 a
		4.24		4.87	1.23
2.0 de ANA + 0.5 de TDZ	2.43 ± 1.03 a		0.87 ± 0.71 a		0.56 ± 0.72 a
0.5 de ANA	2.56 ± 1.82 a		0.81 ± 0.40 a		0.06 ± 0.25 a

*Medias ± desviación estándar,

Letras similares indican que no hay diferencia estadísticamente significativa a un nivel de significancia del 95%.

4.4. Enraizamiento de plantas regeneradas

En el cultivo *in vitro* en ocasiones es necesario transferir los brotes a medios suplementados con auxinas principalmente con la finalidad de producir raíces (Pérez *et al.*, 1999; García 2013). Para el desarrollo de la raíz, se usaron bulbillos de 25 mm de longitud (Figura 3g), y se pudo observar que los bulbillos indujeron de dos a cuatro raíces de buena calidad, sanas, pasando de color blanquecino a café, aproximadamente con una longitud promedio de dos a seis centímetros (Figura 3i). Es importante destacar que, en el caso de los bulbillos trasplantados a medio MS sin RCV, también desarrollaron raíces sanas por lo cual, se considera innecesaria la adición de RCV para el enraizamiento de esta especie.

4.5. Aclimatación y transferencia a condiciones de invernadero

La aclimatación se llevó a cabo transfiriendo plántulas (obtenidas a partir de embriones) a charolas de plástico que contenían sustrato esterilizado (tierra de monte cernida, tepojal, tezontle, 1:1:1) (Figura 3 jkl) donde se mantuvieron 30 días en incubación a 25 ± 0.1 °C. Posteriormente se transfirieron a macetas de plástico de tres pulgadas con el mismo sustrato a condiciones de invernadero durante 30 días. El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue del 100%, cabe resaltar que la selección de bulbos para la etapa de aclimatación fue aleatoria entre los tratamientos antes mencionados.

V. CONCLUSIONES

1. La combinación de TDZ y AIB favoreció la germinación de los embriones.
2. El mejor tratamiento para la inducción de bulbillos adventicios (4.8), se obtuvo al cultivar secciones de escamas de bulbo en medio MS 100% + 1.0 mg L⁻¹ de AIB + 1.0 mg L⁻¹ de TDZ + 1 g L⁻¹ de carbón activado.
3. Los explantes de hoja mostraron los porcentajes más bajos para la inducción de bulbillos adventicios.
4. Se obtuvo un 100% de enraizamiento de las plantas regeneradas.
5. Se logró la adaptación a condiciones de invernadero del 100 % de las plantas regeneradas de *Hymenocallis harrisiana* (Herb.) a partir de la inducción de bulbillos adventicios.

VI. GLOSARIO

Biosíntesis. Síntesis de un determinado compuesto en una célula u organismo vivo.

Bulbillos. Bulbo pequeño que se forma en la axila de las hojas o en la base de un bulbo.

Corona estaminal. Membrana que une entre sí a los filamentos de los estambres.

Criopreservación. Mantenimiento de células, embriones o tejidos congelados, generalmente en nitrógeno líquido.

Embrión. Primera etapa en el desarrollo de los organismos pluricelulares. Sigue inmediatamente a la fusión de los pronúcleos en el óvulo fecundado.

Embriogénesis somática. También denominada embriogénesis asexual, la cual consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión de gametos durante la fecundación o, en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (el embrión) a partir de una célula somática. Este proceso se produce con cierta asiduidad en la naturaleza, ocurriendo de modo espontáneo en más de 60 familias de plantas, algunas tan importantes como las compuestas, brassicáceas, cucurbitáceas, poáceas, rosáceas, fabáceas y aráceas.

Endémico. Presente en un área geográfica determinada.

Explante. Cualquier parte vegetal, puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales

(como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas.

Fitohormona. También llamadas hormonas vegetales son sustancias producidas por células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.

Germoplasma. La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos.

In vitro. Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Organogénesis. En cultivos de tejidos vegetales, formación de órganos como raíces y tallos, a partir de callos o meristemos.

Totipotencia. Célula que tiene la capacidad de dividirse y originar un individuo completo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Arratia R. G. 2014. Efecto del ácido giberélico, kinetina y benciladenina en la morfogénesis *in vitro* de *Eustoma Exaltatum*. Universidad Politécnica de Puebla. Tesis de licenciatura. 97pp.

Bedoya P. C., Ríos R. A. M. 2010. Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum X Powellii* “album” (Amaryllidaceae). Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnologías Escuela de Tecnología Química Pereira. Trabajo de grado. 129pp.

Borys M. W., Leszczynska-borys H., Galván J. L. 2005. *Hymenocallis* Salisb. Germination Variants and Seedling Yield. Universidad Autónoma de Puebla. Agronomía-Recursos Naturales. Acta Horticulturae; 673: 191-198.

Calva C. y Pérez V. 2005. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimento para el Futuro. Revista Digital Universitaria; 6 (11): 16.

Cázarez P. M., Andrade R. M., Villegas M. Á., Alia T. I., Villegas T. O. G. y L. M. V. 2010. Propagación *in vitro* de *Sprekelia Formosissima* Herbert., planta silvestre con potencial ornamental., Revista Fitotecnia Mexicana; 33(3): 197-203.

Chandrasekhar R. M., Brahmachari P. V., Rama M. K. S. 2015. Optimized plant tissue culture protocol for *in vitro* morphogenesis of an endangered medicinal Herb *Ceropegia Ensifolia* Bedd. Tropical and Subtropical Agroecosystems; 18(1): 95-101.

Ferrando K. M. G. 2002. Multiplicación *in vitro* de las especies *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub, *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. y *Rhodophiala splendens*

(Rengifo) Traub. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Tesis de Licenciatura. 82pp.

García M. 2010. Especie nueva de *Hymenocallis* (*Amaryllidaceae*) de Oaxaca y Puebla, México. Revista Mexicana de Biodiversidad; 81: 625- 628.

García R. J. A. 2013. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de Cempaxúchitl (*Tagetes erecta*) vía organogénesis indirecta. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Tesis de Licenciatura. 76pp.

George E. F., Hall M. A. & De Klerk G. J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer.1: 501.

Hussey G. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus*. 1982. Jonh Innes Institute. Annals Botany; 49 (5): 707-719.

Hartmann H. y Kester D. 2001. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Octava reimpresión. Ed. Continental. México. 760 p.

Kohut E., Ördögh, M., Jám bor-Benczúr, E. & Máthé, A. 2007. Results with the establishment of *in vitro* culture of *Leucojum aestivum*. International Journal of Horticultural Science; 13(2): 67-71.

Kumar L., Sincy J., Narmatha B. 2012. Micropropagation of *Tigridia pavonia* (L.f) DC-a potential floricultural plant from twin scale explants. Asian Pacific Journal of Reproduction; 1(1): 38-41.

Lian T., Qun-Xian D., Yong-Qing W., Lu L., Shi-Feng L., Qing-Chun Z., Jian-Xin L. and Xiu-Lan LV. 2009. Studies on the Technique of Tissue Culture and Rapid Propagation of Bulbils From *Lilium regale*. Plant Sciences Research; 2: 14-19.

Lluna R. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. Revista de Horticultura. Madrid; 196: 22-26.

López A. R. y Espejo A. 2002. Flora de Veracruz. *Amaryllidaceae*. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Ver. University of California, Riverside, CA. Fascículo 128: 10-16.

Mendoza M. G. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum oornatum* (De Canolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Tesis de Licenciatura. 87pp.

Menzel E. 2009. Evaluación de la capacidad de regeneración *in vitro* y aclimatación de diferentes variedades híbridas de *Lilium*. Universidad Austral de Chile, Facultad de Agronomía. Tesis de Licenciatura. 57pp.

Mirici, S., Parmaksiz, I., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, C. Sarihan, E., Gümüşçü, A., Gürbüz, B. & Arslan, N. 2005. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 80: 239-246.

Nasircilar A. G., Mirici S., Karaguzel O., Eren O., Baktir İ. 2011. *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types. Turkish Journal of Biology; 35: 37-43.

Ocampo, R. & Balick, M. J. 2009. Plants of Semillas Sagradas: An Ethnomedicinal Garden in Costa Rica, (1st Edition). Finca Luna Nueva Extractos de Costa Rica, S.A. 54-55.

Ozel C. A., Khawar K. M., Unal F. 2015. Factors affecting efficient *in vitro* micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. Saudi Journal of Biological Sciences; 22, 132-138.

Pascual M. E. P. 2007. Propagación *in vitro* de *Ismene amancaes* (R.&P.) Herbert "Amancay" (*Amaryllidaceae*). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Tesis de Licenciatura. 47pp.

Panayotova L. G., Ivanova T. A., Bogdanova Y. Y., Chavdar V., G., Stanilova M. I., Bosseva Y. Zh. & Stoeva T. D. 2008. *In vitro* cultivation of plant species from sandy dunes along the Bulgarian Black Sea Coast. Phytologia Balcanica 14(1): 11-123.

Pigni N. B. 2013. Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos. Las amarilidáceas como fuente de productos bioactivos. Universidad de Barcelona. Tesis doctoral. 205pp.

Raymúndez U. María B., Escala M. y Xena N. 2005. Morfoanatomía foliar como herramienta para la delimitación de especies del género *Hymenocallis* Salisb. (*Amaryllidaceae*) presentes en Venezuela. UCV. Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical, Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela; Acta Botánica Venezuelica; 28(2): 17.

Reyes M. J. E. 2014. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de plantas de la familia *Amaryllidaceae*. Universidad ICESI. Facultad de Ciencias Naturales Química Farmacéutica. Santiago de Cali, Colombia. Tesis de Pregrado. 43pp.

Rodríguez A., Vargas O., Castañeda E. S., Munguía L. G. y Castro A. 2013. *Hymenocallis* y otras plantas con potencial ornamental. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 35pp

Sánchez C. N. G. 2002. Inducción de respuestas morfogénicas en *Diospyros riojae* Gómez-Pompa en la población de Cruz Blanca, municipio de Alto Lucero, Veracruz. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Xalapa, Tesis de maestría. 77pp.

Tapia C. E., Rodríguez D. J. M., Revuelta- A. M. M., Van T. J. M. y Barba G. R. 2012. Mexican Genophytes II. The Genena *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*. Centro de Investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Biotecnología Vegetal, Jalisco, México. Plant Breeding, Wageningen University and Research Center, The Netherlands. Floriculture and Ornamental Biotechnology. Global Science Books. 131-132.

Vargas T., Oropeza M. y García E. 2006. Propagación *in vitro* de *Hippeastrum sp.* Agronomía Tropical; 56(4): 621-626.

Vega N. R., Almada M., Romero Z. P. 1996. Diagnóstico de la problemática de los canales infestados con lirio chino *Hymenocallis sonorensis* en el DR 038; una propuesta para su control. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). II Seminario Internacional sobre Transferencia de Sistemas de Riego. 213-220.

Yanagawa T. & Ito I. 1988-1989. Differences in the Capacity for Bulblet Regeneration between Bulb-scale Explants Excised from Different Parts of *Hymenocallis* and *Ornithogalum* Bulbs. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*; 57 (3): 454-461.

Yew C. K., Balakrishnan B., Sundasekaran J. y Subramaniam S. 2010. The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. School of Biological Sciences, University Sains Malaysia, Minden Heights, 11800 Penang, Malaysia. *Journal of Medicinal Plants Research*; 4(24): 2641-2649.

Yuliyana B., Tatyana S., Stanislav Y., Bozhidarka P., Emil M., Monique B., & Marina S. 2008. Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term *in vitro* cultivation of *Leucojum aestivum* L. *In vitro*. *Cellular & Developmental Biology-Plan*; 45(4): 458-465.

Uzun S., Parmaksiz İ., Uranbey S., Mirici S., Sarihan E.O., İpek A., Kaya M. D., Gürbüz B., Arslan N., Sancak C., Khawar K. M., Özcan S. 2014. *In vitro* micropropagation from immature embryos of the endemic and endangered *Muscari muscarimi* Medik. *Turkish Journal of Biology*; 38: 83-88.

Varutharaju K., Raju C. S., Thilip C., Aslam A., and Shajahan A. 2014. High efficiency direct shoot organogenesis from leaf segments of *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schult by Using Thidiazuron. *The Scientific World Journal* 2014 (652919): 6.

Fuentes electrónicas

pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Hymenocallis (16 de marzo de 2015).

conabio.inaturalist.org/taxa/147256-Hymenocallis-harrisiana (16 de marzo de 2015).

conabio.gob.mx/malezasdemexico/amaryllidaceae/hymenocallisharrisiana/fichas/ficha.htm. (16 de marzo de 2015).

conabio.inaturalist.org/taxa/126795-Hymenocallis#Distribuci.C3.B3n (23 de marzo de 2015).

intergardening.com/a-z-plants/garden-plants-h/hymenocallis.html (29 de marzo de 2015).

www.sinarefi.org.mx/redes/red_hymenocallis.html (20 de octubre de 2015).

plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=hyro2_002_ahp.jpg (05 de mayo de 2016).

planetatepoztlan.mx/la-canada-de-san-geronimo-y-la-cebolla-de-monte/ (05 de mayo de 2016).