

SEP

# POLIBOTÁNICA

ISSN 1405-2768



Enero 2023

Núm. 55

POLIBOTÁNICA



CONACYT



Núm. 55

Enero 2023

## PÁG.

## CONTENIDO

- 1 Clave para identificar las especies del género *Bursera* Jacq. ex L. (Burseraceae) en el estado de Michoacán, México.  
*Key for the identification of species of the genus Bursera Jacq. ex L. (Burseraceae) in the state of Michoacan, Mexico.*  
Rzedowski, J. | R. Medina-Lemos
- 11 Diversidad y estructura arbórea de un bosque templado bajo manejo en el municipio de Pueblo Nuevo, Durango, México.  
*Diversity and tree structure of a managed temperate forest in the municipality of Pueblo Nuevo, Durango, Mexico.*  
Flores-Morales, E.A. | O.A. Aguirre-Calderón | E.J. Treviño-Garza | M.A. González- Tagle | E. Alanís-Rodríguez | G. Angeles-Pérez | F. Huizar-Ámezcuca.
- 27 Estructura, composición florística, biomasa aérea y contenido de carbono en la selva mediana perennifolia en Tizimín, Yucatán, México.  
*Structure, floristic composition, above-ground biomass and carbon content in tropical evergreen forest in Tizimin, Yucatan, Mexico.*  
Martínez-Gauna, C.A. | J.I. Yerena-Yamallel | L.G. Cuéllar-Rodríguez | E. Alanís-Rodríguez | E. J. Ortega-Arroyo.
- 51 Comparación de valores estructurales de manglar en diferentes condiciones de degradación ecológica.  
*Comparison of mangrove structural values in different conditions of ecological degradation.*  
Basañez-Muñoz, A. de J. | A. Serrano | L. Cuervo-López | C. Naval-Avila | A. Capistrán-Barradas | A.G. Jordán-Garza.
- 71 Evaluación de una restauración mediante dron en el matorral espinoso tamaulipeco.  
*Evaluation of a restoration through drone in the tamaulipeco thornscrub.*  
Gutiérrez-Barrientos, M. | J.D. Marín-Solís | E. Alanís-Rodríguez | E. Buendía-Rodríguez.
- 87 Efecto de la cobertura y condiciones edáficas en la presencia de *Amoreuxia wrightii* A. Gray, en el noreste de México.  
*Effect of coverage and edaphic conditions on the presence of Amoreuxia wrightii A. Gray, in northeastern Mexico.*  
Patiño-Flores, Á.M. | E. Alanís-Rodríguez | V.M. Molina-Guerra | M.I. Yáñez-Díaz | A. Mora-Olivo | E. Jurado | H. González-Rodríguez
- 101 Componentes del rendimiento de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en Guerrero, México.  
*Yield components of Crotalaria longirostrata Hook. & Arn. in Guerrero, Mexico.*  
Salinas-Morales, J.L. | C.B. Peña-Valdivia | C. Trejo | M. Vázquez-Sánchez | C. López-Palacios | D. Padilla-Chacón.
- 123 Germinación y multiplicación de plantas *in vitro* de *Heimia salicifolia* (Lythraceae).  
*Germination and micropropagation in vitro of Heimia salicifolia (Lythraceae).*  
Ordoñez-Posadas, F. | M. de L. Martínez-Cárdenas | J.L. Rodríguez de la O.
- 139 Micropropagación de *Agave maximiliana* Baker por proliferación de yemas axilares.  
*Micropropagation of Agave maximiliana Baker por proliferation of axillary shoot proliferation.*  
Santacruz-Ruvalcaba, F. | J.J. Castañeda-Nava | J.P. Villanueva-González | M.L. García-Sahagún | L. Portillo | M.L. Contreras-Pacheco.
- 153 Origen botánico y caracterización fisicoquímica de la miel de meliponinos (Apidae:Meliponini) de Teocelo, Veracruz, México.  
*Botanical origin and physicochemical characterization of meliponini honey (Apidae:Meliponini) from Teocelo, Veracruz, Mexico.*  
Ortiz-Reyes, L.Y. | D.L. Quiroz- Garcia | M.L. Arreguín-Sánchez | R. Fernández-Nava.
- 171 Comparación anatómica de la lámina foliar de cinco especies leñosas nativas del noreste de México durante la época húmeda y seca.  
*Leaf blade anatomical comparison of five native woody species of northeastern Mexico during the wet and dry season.*  
Filió-Hernández, E. | H. González-Rodríguez | I. Cantú-Silva | T.G. Domínguez-Gómez | J.G. Marmolejo-Monsivais | M.V. Gómez-Meza.
- 185 Estudio anatómico e histoquímico de los órganos vegetativos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae).  
*Anatomical and histochemical study of the vegetative organs of Piper aduncum L. (Piperaceae).*  
Arroyo, J. | P. Bonilla | M. Marín | G. Tomás | J. Huamán | G. Ronceros | E. Raez† | L. Moreno | W. Hamilton.
- 203 Evaluación del efecto hipoglucémico de *Tectaria heracleifolia* (Willd.) Underw. en ratones con diabetes inducida tipo 2.  
*Evaluación del efecto hipoglucémico de Tectaria heracleifolia (Willd.) Underw. en ratones con diabetes inducida tipo 2.*  
Luna-Rodríguez, A.K. | M.A. Zenil-Zenil | S. Cristians | A.M. Osuna-Fernández | H.R. Osuna-Fernández.
- 219 Árboles nativos de Sinaloa del sistema agroforestal huerto familiar.  
*Native trees of Sinaloa at the homegardén agroforestry system.*  
Avenidaño-Gómez, A. | B. Salomón-Montijo | G. Márquez-Salazar.
- 241 Atributos tangibles e intangibles y diferenciación sensorial de la vainilla mexicana.  
*Tangible and intangible attributes and sensory differentiation of mexican vanilla.*  
Barrera-Rodríguez, A.I. | A. Espejel | M.G. Pérez | A.G. Ramírez-García.
- 257 Percepción local de los usos y situación ambiental y económica del toronjil (Lamiaceae) en tres comunidades del estado de Guerrero, México.  
*Local perception of the situation, environmental and economic uses of toronjil (Lamiaceae) in three communities of the state of Guerrero, Mexico.*  
Hernández-Ramírez, U. | M. Trujillo-Nájera | T. Romero-Rosales | A. Huicochea-Moctezuma | T. de J. Adame-Zambrano | M. A. Gruintal-Santos.
- 271 Importancia relativa de las especies medicinales ofertadas en el mercado de Tepeaca, Puebla, México.  
*Relative importance of medicinal species offered in the Tepeaca market, Puebla, Mexico.*  
Reyes-Matamoros, J. | D. Martínez-Moreno | J.G. Fuentes-López | F. Basurto-Peña.

# POLIBOTÁNICA

Núm. 55

ISSN electrónico: 2395-9525

Enero 2023

## Portada

*Bidens pilosa* L. Asteraceae. "Acahual".  
Achenios de 5 a 18 mm de largo, los interiores lineares y más largos, los exteriores más o menos comprimidos dorso-ventralmente y más cortos, negruzcos a café, vilano con 3-2 aristas amarillas, de 1 a 3 mm de largo. Planta con múltiples propiedades terapéuticas, considerada en medicina popular como diurética y febrífuga, estomacal y antiulcerosa, para curar catarros con fiebre, faringitis y amigdalitis.



*Bidens pilosa* L. Asteraceae. "Acahual".  
Achenes 5 to 18 mm long, inner ones linear and longer, outer ones more or less dorso-ventrally compressed and shorter, blackish to brownish, pappus with 3-2 yellow awns, 1 to 3 mm long. Plant with multiple therapeutic properties, considered in folk medicine as diuretic and febrifuge, stomachic and anti-ulcerous, to cure colds with fever, pharyngitis, and tonsillitis.

por/by **Rafael Fernández Nava**



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Director General: *Dr. Arturo Reyes Sandoval*

Secretario General: *Ing. Arq. Carlos Ruiz Cárdenas*

Secretario Académico: *Mtro. Mauricio Igor Jasso Zaranda*

Secretario de Innovación e Integración Social: *M. en C. Ricardo Monterrubio López*

Secretario de Investigación y Posgrado: *Dra. Laura Arreola Mendoza*

Secretario de Servicios Educativos: *Dra. Ana Lilia Coria Páez*

Secretario de Administración: *M. en C. Javier Tapia Santoyo*

Director de Educación Superior: *Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo*

## ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Maestra Decana en Funciones de Dirección:

*M. en C. Yadira Fonseca Sabater*

Subdirectora Académica:

*M. en C. Martha Patricia Cervantes Cervantes*

Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación:

*Dr. Gerardo Aparicio Ozores*

Subdirector de Servicios Educativos e Integración Social:

*Biól. Gonzalo Galindo Becerril*

---

**POLIBOTÁNICA**, Año 28, No. 55, enero-junio 2023, es una publicación semestral editada por el Instituto Politécnico Nacional, a través de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas C.P. 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F. Teléfono 57296000 ext. 62331. <http://www.herbario.encb.ipn.mx/>, Editor responsable: Rafael Fernández Nava. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-011309001300-203. ISSN impreso: 1405-2768, ISSN digital: 2395-9525, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Unidad de informática de la ENCB del IPN, Rafael Fernández Nava, Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas CP 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Politécnico Nacional.

REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**EDITOR EN JEFE**

*Rafael Fernández Nava*

**EDITORA ASOCIADA**

*María de la Luz Arreguín Sánchez*

**COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL**

*Christiane Anderson*  
University of Michigan  
Ann Arbor, Michigan, US

*Edith V. Gómez Sosa*  
Instituto de Botánica Darwinion  
Buenos Aires, Argentina

*Heike Vibrans*  
Colegio de Postgraduados  
Estado de México, México

*Jorge Llorente Bousquets*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

*Graciela Calderón de Rzedowski*  
Instituto de Ecología del Bajío  
Pátzcuaro, Mich., México

*Delia Fernández González*  
Universidad de León  
León, España

*Theodore S. Cochrane*  
University of Wisconsin  
Madison, Wisconsin, US

*Jerzy Rzedowski Rotter*  
Instituto de Ecología del Bajío  
Pátzcuaro, Mich., México

*Hugo Cota Sánchez*  
University of Saskatchewan  
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

*Luis Gerardo Zepeda Vallejo*  
Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México, México

*Fernando Chiang Cabrera*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

*Claude Sastre*  
Muséum National d'Histoire Naturelle  
Paris, Francia

*Thomas F. Daniel*  
California Academy of Sciences  
San Francisco, California, US

*Mauricio Velayos Rodríguez*  
Real Jardín Botánico  
Madrid, España

*Francisco de Asis Dos Santos*  
Universidad Estadual de Feira de Santana  
Feira de Santana, Brasil

*Noemí Waksman de Torres*  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Monterrey, NL, México

*Carlos Fabián Vargas Mendoza*  
Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México, México

*Julieta Carranza Velázquez*  
Universidad de Costa Rica  
San Pedro, Costa Rica

*José Luis Godínez Ortega*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

*Tom Wendt*  
University of Texas  
Austin, Texas, US

*José Manuel Rico Ordaz*  
Universidad de Oviedo  
Oviedo, España

**DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA**

*Luz Elena Tejeda Hernández*

**OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN**

*Pedro Aráoz Palomino*

Toda correspondencia relacionada con la revista deberá ser dirigida a:

**Dr. Rafael Fernández Nava**

Editor en Jefe de

## POLIBOTÁNICA

Departamento de Botánica

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

Apdo. Postal 17-564, CP 11410, Ciudad de México

Correo electrónico:

*polibotanica@gmail.com*

*rfernan@ipn.mx*

Dirección Web

*http://www.polibotanica.mx*

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

CONACYT, índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

SciELO - Scientific Electronic Library Online.

Google Académico - Google Scholar.

DOAJ, Directorio de Revistas de Acceso Público.

Dialnet portal de difusión de la producción científica hispana.

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.

LATINDEX, Sistema regional de información en línea para revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.

PERIODICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.



# CONCENTRACIÓN DE KINETINA Y TIPO DE EXPLANTE EN LA MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.

# KINETIN CONCENTRATION AND EXPLANT TYPE IN *in vitro* MULTIPLICATION OF *Sequoia* *sempervirens* (D. Don) Endl.

**Castro Garibay, S.L.; A. Villegas Monter y I.J. Cruz Larios**

CONCENTRACIÓN DE KINETINA Y TIPO DE EXPLANTE EN LA  
MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl.

KINETIN CONCENTRATION AND EXPLANT TYPE IN *in vitro* MULTIPLICATION  
OF *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl.



## Concentración de kinetina y tipo de explante en la multiplicación *in vitro* de *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl.

### Kinetin concentration and explant type in *in vitro* multiplication of *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl.

Castro Garibay, S.L.;  
A. Villegas Monter  
y I.J. Cruz Larios

COMPONENTES DEL  
RENDIMIENTO DE  
*Crotalaria longirostrata* HOOK.  
& ARN. EN GUERRERO,  
MEXICO

YIELD COMPONENTS OF  
*Crotalaria longirostrata* HOOK.  
& ARN. IN GUERRERO,  
MEXICO

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 53: 81-94. Enero 2022

DOI:  
10.18387/polibotanica.55.6

S.L. Castro Garibay / sandracastro9024@gmail.com

A. Villegas Monter / villemas53@hotmail.com

Colegio de Postgraduados, Postgrado en Fisiología Vegetal.

I.J. Cruz Larios / iris.crul22@gmail.com

Postgrado en Ciencias Forestales.

Km. 36.5, Carretera México- Texcoco, Montecillo estado de México, C.P. 56230.

**RESUMEN:** *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl. es considerado el árbol de mayor altura en el mundo, con bajo porcentaje de germinación, por lo cual, se ha recurrido al cultivo *in vitro* para su propagación, pero los protocolos desarrollados para obtener brotes son poco eficaces. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un esquema eficiente de multiplicación *in vitro* de *S. sempervirens* utilizando explantes de tallo apicales y basales, cuatro concentraciones de kinetina, además de un medio de cultivo con baja concentración de sales para sustituir el uso del medio MS. Se establecieron *in vitro* 20 yemas axilares de una planta de 18 años, después de tres subcultivos fueron colocados tres experimentos consecutivos cada seis semanas. Se evaluaron cuatro concentraciones de kinetina (6-furfuril-aminopurina) (0, 0.92, 1.85 y 3.71  $\mu\text{M}$ ) y dos tipos de explantes: apicales y basales. Las variables evaluadas fueron: incremento de altura, crecimiento a través del tiempo, número de brotes axilares emitidos por tipo de explante. Los mayores incrementos en altura de explantes apicales (2.35, 4.26 y 4.78 cm) se obtuvieron con 0  $\mu\text{M}$  de kinetina, en los tres experimentos. En las semanas dos y cuatro, se presentaron los mayores incrementos en altura en todos los tratamientos evaluados. La mayor cantidad de brotes se obtuvieron en explantes basales (2.11). El esquema de propagación *in vitro* de *S. sempervirens* fue eficiente con explantes apicales y basales, y el crecimiento de los explantes fue satisfactorio con 12.38 mM de nitrógeno total en el medio de cultivo.

**Palabras clave:** Brotación, concentración de citocinina, micropropagación, propagación vegetativa.

**ABSTRACT:** *Sequoia sempervirens* is the tallest tree in the world, it has a low germination percentage, due to it the *in vitro* tissue culture has been used for its propagation. Even so, the multiplication technique development is still not efficient. This work aimed to the development of an efficient protocol for *in vitro* multiplication of *S. sempervirens*, using apical and basal stem explants, and four concentrations of kinetin and a culture medium with a low concentration of mineral salts to replace the use of the MS medium. Twenty axillary buds from an 18-years-old tree were established *in vitro*, after three subcultures, three experiments were established every six weeks. Kinetin (6-furfuryl-aminopurin) concentrations (0, 0.92, 1.85 y 3.71  $\mu\text{M}$ ) and two types of explants: apical and basal, were evaluated. The parameters evaluated were: height increase, over time growth, and number of axillary shoots emitted by explant type. The height increase for the three experiments was in apical explants (2.35, 4.26, and 4.78 cm) with 0  $\mu\text{M}$  kinetin. The greatest increases in height of apical explants (2.35, 4.26 and 4.78 cm) were obtained with 0  $\mu\text{M}$  of kinetin, in the three experiments. The greatest increases in height were in all evaluated treatments in the second and the fourth week. The greatest number of axillary shoots (2.11) were obtained in basal explants. The *in vitro* propagation protocol for *S. sempervirens* using



apical and basal explants is efficient, the growth of the explants was successful with 12.38 mm of total nitrogen in culture medium.

**Key words:** Sprouting, cytokinin concentrations, micropropagation, vegetative propagation.

## INTRODUCCIÓN

*Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl. pertenece a la familia Taxodiaceae; especie poliploide ( $2n = 6x = 66$ ) (Ahuja, 2005), originaria de la costa oeste de California y suroeste de Oregón, Estados Unidos (Olson *et al.*, 1990). Se ha introducido como especie de ornato en: Nueva Zelanda (Davies *et al.*, 2014), Brasil (Ribeiro *et al.*, 2011), Rumania (Clapa *et al.*, 2010), Chile (Toral Ibañez *et al.*, 2009), Italia (Ozudogru *et al.*, 2011) y España (Rojas-Vargas *et al.*, 2021).

*S. sempervirens* presenta bajo porcentaje de germinación (10%) y problemas de crecimiento de las plántulas (Olson, Roy, & Walters, 1990), debido a ello se ha optado por métodos de propagación asexual, como enraizamiento de estacas (Pereira, Ângelo, Navroski, Dobner Júnior, & De Oliveira, 2017) y cultivo *in vitro* (Rojas Vargas *et al.*, 2021).

En cultivo *in vitro*, aspectos como concentración de macro y micronutrientes, tipo y concentración de carbono, pH, y reguladores de desarrollo afectan el crecimiento en explantes (Molinos Da Silva *et al.*, 2004). Para la proliferación de brotes en cultivo *in vitro* son utilizadas las citocininas (Hill & Schaller, 2013).

En *S. sempervirens* o secuoya se han realizado protocolos de embriogénesis somática (Liu, Xia, Yin, Huang, & Zhou, 2006), proliferación de brotes axilares (Whan Sul & Korban, 1994), en donde se utilizan principalmente sales MS (Murashige & Skooge, 1962), las cuales contienen concentraciones altas de macronutrientes. En el caso de proliferación de brotes se han empleado ápices (Ribeiro *et al.*, 2011), ocasionando crecimiento en longitud, con tasa de multiplicación baja, pero no se han explorado metodologías con medios de cultivo diferentes a los comúnmente usados (Phillips & Garda, 2019), además de explantes de tallo con y sin yemas apicales.

Secuoya tiene un papel ecológico importante en el área de distribución natural, y potencial como especie de ornato, por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología *in vitro* para la proliferación de *S. sempervirens* D. Don. Endl. utilizando explantes de tallo apicales y basales, cuatro concentraciones de kinetina, además de un medio de cultivo con baja concentraciones de sales para sustituir el uso del medio MS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y desinfección

En febrero de 2019 se recolectaron brotes laterales de 15 cm con yemas axilares en crecimiento activo, de un árbol de *S. sempervirens* de 18 años ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo. Los brotes fueron lavados con agua y jabón, con cepillo dental se frotaron en sentido del crecimiento de las yemas, enjuagaron con agua y obtuvieron fracciones de tallo con dos yemas, para facilitar la desinfección en la campana de flujo laminar.

Las soluciones utilizadas para desinfectar el tejido fueron: etanol 80%, hipoclorito de sodio comercial (10%) y peróxido de hidrógeno comercial (10%) por 2, 5 y 10 minutos, respectivamente; finalmente se realizaron tres enjuagues con agua desionizada estéril, de 5, 3 y 1 min. Al terminar dicho proceso, las fracciones de tallo se mantuvieron en agua desionizada estéril para evitar su deshidratación.

### Medio de cultivo y establecimiento de explantes

Los componentes del medio de cultivo para establecimiento fueron: agar (Sigma®) y azúcar comercial no refinada; con 6 y 20 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, estabilizado a pH 5.7 y esterilizado a 20 libras de presión en autoclave, por 15 minutos. Del material vegetal se extrajeron 20 ápices y colocaron en tubos de ensayo (25 × 150 mm) con 10 mL de medio de cultivo antes mencionado. Una semana después de colocar los ápices en medio de establecimiento, aquellos que no presentaron contaminación se subcultivaron en el medio de cultivo para multiplicación (Tabla 1), con pH de 5.7 y esterilizado a 20 libras de presión, durante 15 minutos. Todos los reactivos utilizados fueron marca Sigma®.

**Tabla 1.** Medio de cultivo para multiplicación de *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl.

Nutrientos	Concentración
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8 mM
KNO <sub>3</sub>	6 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.5 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
Quelatos*	0.1 mM
Micronutrientos**	0.1 mM
Ácido indolbutírico	0.98 µM
Kinetina	1.85 µM
Sacarosa	20 g
Agar	6 g

\*Quelatos: FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (695 mg) y Na EDTA (931 mg), preparados en 250 mL de agua desionizada.

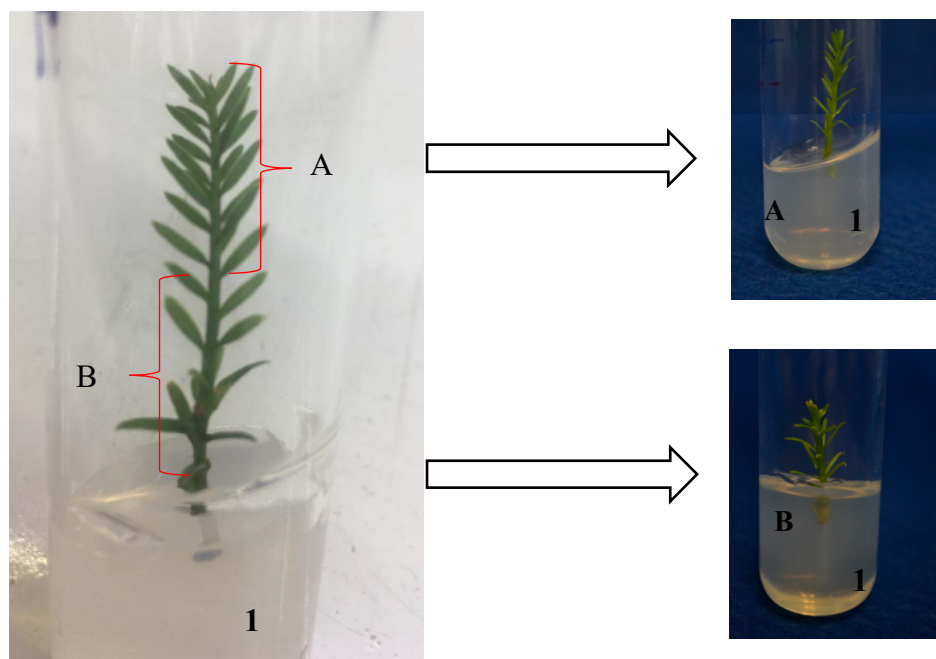
\*\* Micronutrientos: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 155 mg, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O: 422.5 mg, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O: 215 mg, Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O: 6.25 mg, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O: 0.625 mg, preparados en 250 mL de agua desionizada. Las concentraciones de los componentes del medio de cultivo fueron para preparar un litro de medio.

### Multiplicación y tratamientos establecidos

El material vegetal para establecer tres experimentos consecutivos se obtuvo siete meses después de hacer el establecimiento *in vitro*. Durante este tiempo se hicieron tres subcultivos en el medio para multiplicación (Tabla 1) con el fin de tener la cantidad de explantes suficientes.

Los tratamientos establecidos fueron ocho: dos tipos de explante (apical y basal) que se obtuvieron del mismo brote (Fig. 1) y cuatro concentraciones de kinetina (6- furfurilaminopurina) 0, 0.92, 1.85 y 3.71 µM L<sup>-1</sup>, con las que fue suplementado el medio de cultivo para multiplicación (Tabla 1). En cada tratamiento se utilizaron 12 explantes, siendo estos las unidades experimentales, numerados del 1 al 12.

Los subcultivos (experimentos) se hicieron cada seis semanas. Las evaluaciones se hacían en ambos tipos de explantes, pero para establecer el experimento posterior solo se utilizaron explantes apicales, por dos razones, la primera, debido a la longitud que estos presentaban para obtener secciones apical y basal, y la segunda, para mantener el orden de la numeración colocada a los brotes (Fig. 1). El cuarto de incubación *in vitro* se mantuvo a 25 °C y fotoperiodo de 16 horas.



**Fig. 1.** Tipo de explante utilizado en la multiplicación *in vitro* de *S. sempervirens*. A: apical; B; basal.

### Variables evaluadas

#### Crecimiento de explantes apicales

Al momento del subcultivo se midió la longitud inicial de los explantes, y durante seis semanas se colocaron marcas en el tubo de ensayo para denotar el crecimiento de los segmentos. La altura real de cada explante se midió con papel milimétrico durante el subcultivo, determinando así el incremento de cada uno de ellos. Dicho proceso se hizo en los tres experimentos.

#### Efecto del tipo de explante en la brotación

En los tres experimentos se determinó de manera visual el desarrollo de yemas laterales, y durante el subcultivo de ambos tipos de explantes se contaron los brotes laterales aptos para ser utilizados. Los criterios que se consideraron para brotes aptos fueron: no presentar hiperhidratación, longitud mayor a 0.5 cm y cuando eran  $\geq 5$  cm, fueron divididos en segmentos apical y basal. En todos los subcultivos realizados se obtuvo material vegetativo extra, que se colocó en medio de cultivo para multiplicación (Tabla 1) con el objetivo de seguir multiplicando la especie, pero sin fines de experimentación.

#### Diseño experimental y análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial ( $2 \times 4$ ). Dos tipos de explantes (apical y basal) y cuatro concentraciones de kinetina (0, 0.92, 1.85 y  $3.71 \mu\text{M L}^{-1}$ ). Para los análisis de incremento en altura, solo se tomaron en cuenta los explantes apicales, haciendo pruebas de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ), con el programa SAS 9.4, las unidades experimentales fueron 12 ya que se analizaron los tres experimentos por separado. Se usó el análisis de series de tiempo (Minitab 18.1), para determinar la dinámica de crecimiento semanal, utilizando 36 unidades experimentales por tratamiento, tomando en cuenta los datos de los tres experimentos.

El efecto del tipo de explante en el número de brotes emitidos, se analizó con regresión Poisson (R 4.1.0), debido a que es variable de conteo. Para el número total de brotes aptos para subcultivo, se determinaron por conteo directo; reportándose de la misma forma. Las unidades

experimentales usadas fueron 48 (resultado de 12 explantes por cuatro tratamientos), ya que no se tomaron en cuenta las concentraciones de kinetina.

## RESULTADOS

### Establecimiento

De los 20 ápices colocados en el medio de cultivo para establecimiento, ninguno presentó daño visible por la desinfestación utilizada. A pesar de haber utilizado material de campo, no hubo contaminación ni oxidación. Lo que permite señalar que el protocolo de desinfestación aplicado y las medidas asépticas utilizadas durante el proceso de establecimiento; fueron eficientes.

Para obtener material suficiente y establecer los experimentos, fue necesario hacer tres subcultivos en medio para multiplicación (Tabla 1), el primero fue 3 meses después de colocados los 20 ápices, y se obtuvieron 27 brotes, en el segundo, un mes después se lograron 43 brotes y el último subcultivo se hizo seis semanas después con 75 brotes. El incremento en el número de brotes, del primero al tercer subcultivo puede deberse a que los explantes se adaptaron a las condiciones *in vitro*.

### Incremento en altura

Con el medio de cultivo y las concentraciones de kinetina utilizadas, se generaron brotes de 3.46 – 7.05 cm, longitud suficiente para obtener fracciones de tallos de 1.5 – 2 cm para realizar subcultivos y seguir con el proceso de multiplicación de la especie.

Respecto a la prueba de medias, en el primer experimento no hubo diferencias estadísticas, pero sí en los posteriores. En los experimentos dos y tres, en el tratamiento sin kinetina se obtuvieron los mayores incrementos con 4.26 y 4.78 cm, respectivamente (Tabla 2). De manera general, con las concentraciones 0.92, 1.85 y 3.71  $\mu\text{M L}^{-1}$  de kinetina, el incremento en altura disminuyó del experimento dos al tres, lo que indica que secuoya en condiciones *in vitro* no requiere kinetina para crecimiento.

**Tabla 2.** Comparación de medias para incremento en altura (cm) de *S. sempervirens*, en los tres experimentos realizados.

Kinetina ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3	
	AI (cm)	Incremento (cm)	AI (cm)	Incremento (cm)	AI (cm)	Incremento (cm)
0	2.08	2.35 a	2.03	4.26 a	2.27	4.78 a
0.92	2.02	1.85 a	1.96	2.99 b	1.92	2.20 b
1.85	2.34	1.88 a	1.84	2.92 b	2.09	2.58 b
3.71	2.54	2.15 a	1.96	2.71 b	1.96	1.50 b
DMSH		1.11		1.22		1.17

Exp.1: Experimento 1; Exp.2: Experimento 2; Exp.3: Experimento 3; AI: altura inicial DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística significativa;  $p = 0.05$ ;  $n = 12$ .

### Crecimiento en el tiempo

Determinar el crecimiento de los explantes a través del tiempo, proporciona información para definir cuándo deben realizarse los subcultivos, ya que al colocar el explante en medio nuevo, la disponibilidad de nutrimentos y reguladores de desarrollo es mayor, lo que permite el crecimiento del brote.

Los experimentos se establecieron cada seis semanas, sin embargo, de acuerdo con los resultados se demuestran que los subcultivos para secuoya puede realizarse a las cinco semanas (Fig. 2, Tabla 3), ya que en la semana cuatro y cinco no se observa elongación del brote. Sin embargo, el pronóstico de crecimiento (Tabla 3), muestra que en la semana siete puede existir crecimiento, por lo que secuoya pudiera subcultivarse hasta esa semana, pero es necesario corroborarlo mediante experimentos.

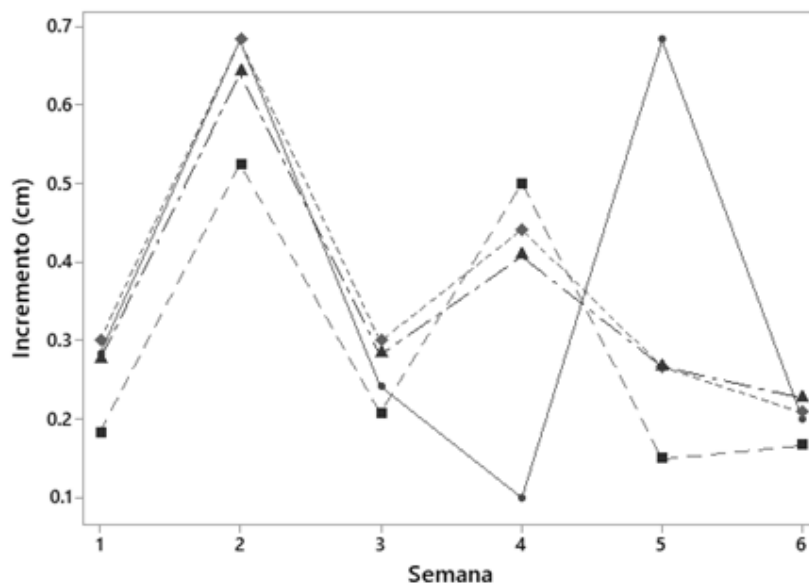


Fig. 2. Incremento en altura de explantes apicales de *S. sempervirens* a través del tiempo, en concentraciones de kinetina  $\mu\text{M}$  (0  $\rightarrow$   $\bullet$ , 0.92  $\rightarrow$   $\blacksquare$ , 1.85  $\rightarrow$   $\blacklozenge$  y 3.71:  $\blacktriangle$ ),  $n = 36$ .

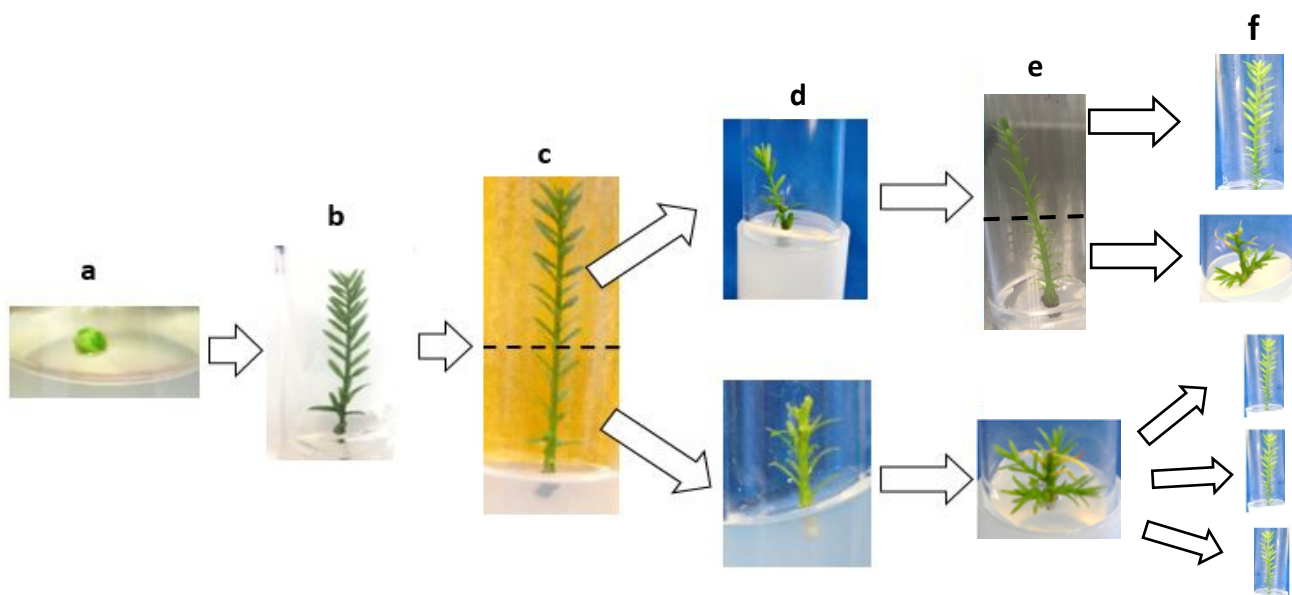
Tabla 3. Pronóstico de crecimiento de explantes apicales de *S. sempervirens* a través del tiempo, en cultivo *in vitro*

Semanas	Concentraciones de kinetina ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )			
	0'	0.92 <sup>□</sup>	1.85 <sup>◇</sup>	3.71 <sup>△</sup>
<b>Crecimiento (cm)</b>				
1	0.28	0.18	0.30	0.28
2	0.68	0.53	0.68	0.64
3	0.24	0.21	0.30	0.28
4	0.10	0.50	0.44	0.41
5	0.68	0.15	0.27	0.27
6	0.20	0.17	0.21	0.23
<b>Pronóstico</b>				
7	0.31	0.20	0.21	0.23
8	0.29	0.17	0.17	0.19
9	0.28	0.14	0.12	0.16
10	0.26	0.12	0.08	0.12

Ecuaciones de pronósticos de crecimiento de *S. sempervirens* en concentraciones de kinetina, '  $Y_t = 0.421 - 0.0160 \times t$ ; <sup>□</sup>  $Y_t = 0.381 - 0.0262 \times t$ ; <sup>◇</sup>  $Y_t = 0.523 - 0.0447 \times t$ ; <sup>△</sup>  $Y_t = 0.474 - 0.0354 \times t$ ;  $Y_t$ : Altura del explante con respecto al tiempo;  $t$ : tiempo en semanas.

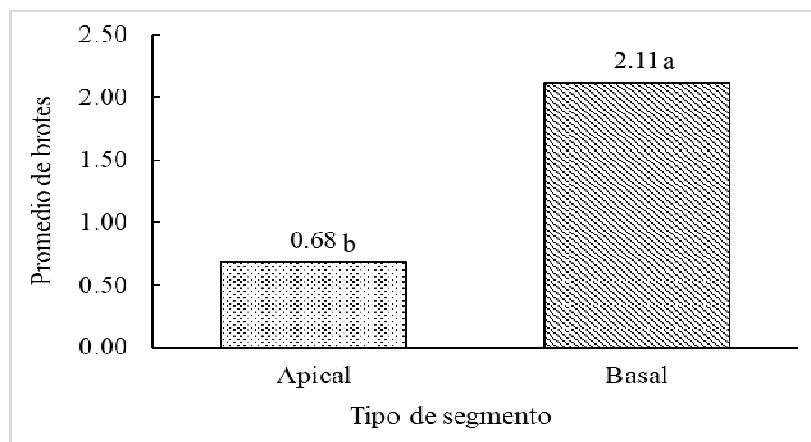
### Efecto del tipo de explante en la brotación

Con el esquema de propagación establecido se determinó que la multiplicación de secuoya puede realizarse por elongación y formación de brotes axilares (Fig. 3) aumentando la tasa de multiplicación. Cabe mencionar que para fines del experimento los segmentos apicales y basales, tenían en promedio 2 cm de longitud, pero en subcultivos (que no formaban parte del experimento) se colocaron segmentos de 1–1.5 cm, obteniendo brotes aptos para multiplicación, lo que hace aún más eficiente la metodología propuesta.



**Fig. 3.** Esquema de propagación propuesto para *S. sempervirens*. a) yema apical, b) elongación, c) obtención de explantes apicales y basales, d) multiplicación por explantes apicales y basales e) crecimiento y brotación de explantes y f) obtención y subcultivo de brotes.

Respecto al número de brotes originados por tipo de explante, en los basales se obtuvieron más brotes axilares en promedio con respecto a los apicales (Fig. 4), esto debido a la pérdida de dominancia apical. El uso de explantes basales en la multiplicación *in vitro* de secuoya no se utiliza, en este trabajo se utilizaron y demostraron una respuesta favorable en la formación de brotes, además puede ser una alternativa para aumentar de manera eficiente la multiplicación.



**Fig. 4.** Efecto del explante en la cantidad de brotes axilares emitidos. Letras diferentes en las barras indican diferencia estadística significativa,  $p = 0.05$ ,  $n = 48$  por tipo de explante.

Respecto al número de brotes (Tabla 4), se clasificaron en totales (tomando en cuenta todos los brotes sin importar la condición) y óptimos para subcultivo los cuales tenían al menos 2 cm de longitud y no presentar hiperhidratación. En los tres experimentos, la cantidad inicial de explantes fueron 12 por tipo de explante.

De manera general, en los explantes apicales se obtuvieron más brotes óptimos para subcultivo que en las fracciones basales. Con  $0.92 \mu\text{M L}^{-1}$  de kinetina la eficiencia de brotes aptos fue de 90.8%, y con  $3.71 \mu\text{M L}^{-1}$  solamente 77.2%. Respecto a la cantidad de brotes emitidos, con tres subcultivos realizados, la tendencia general en los explantes es a disminuir, siendo más notorio en los explantes basales, y en los apicales del segundo al tercer subcultivo el número de brotes se mantiene, y solo en la concentración de  $3.71 \mu\text{M L}^{-1}$  aumenta (Tabla 4). Probablemente esto sucedió porque para los tres experimentos, los 12 explantes apicales iniciales se mantuvieron en cada experimento y tratamiento, ya que estos dieron origen a los explantes para los subcultivos posteriores; afectando probablemente la tasa de multiplicación.

**Tabla 4.** Cantidad de brotes totales y aptos por subcultivo de acuerdo a concentración de kinetina y tipo de explante.

Kinetina ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )	NB	Exp.1		Exp.2		Exp.3		Total
		Tipo de explante						
		Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	
0	BT	33	55	24	64	24	31	231
	BO	24	32	27	35	28	24	170
0.92	BT	36	45	26	44	27	29	207
	BO	24	30	26	40	31	37	188
1.85	BT	38	50	30	58	29	28	233
	BO	24	30	33	34	30	20	171
3.71	BT	33	55	33	63	39	36	259
	BO	24	35	36	41	41	23	200

NB: número de brotes; BT: brotes totales; BO: brotes aptos para subcultivo; E1: experimento 1; E2: experimento 2; E3: experimento 3; BTE: brotes totales de todos los experimentos.  $n = 12$  por tipo de segmento.

De acuerdo con las observaciones y datos obtenidos, las yemas en secuoya son visibles en la segunda semana de subcultivo; habiendo más en explantes basales que en apicales. Se considera que secuoya puede multiplicarse utilizando ambos tipos de explantes: apical y basal, y con el último obtener mayor proliferación.

## DISCUSIÓN

El cultivo *in vitro* en plantas es una técnica que se ha utilizado en la multiplicación de especies ornamentales, forestales, y frutales, con propósito distintos. Para el desarrollo de un protocolo de micropropagación es necesario contar con una metodología adecuada para desinfección del explante inicial; los productos más utilizados para dicho proceso son: hipoclorito de sodio, de calcio, cloruro de mercurio y Tween-20, para el caso de secuoya no es la excepción (El-kadder & Fathy, 2012). Sin embargo, estos pueden resultar tóxicos para el investigador y dañinos para el ambiente. Chen *et al.* (2017) mencionan que el peróxido de hidrógeno y dióxido de cloro son alternativas efectivas para eliminar agentes patógenos en explantes establecidos *in vitro*. En el protocolo de desinfección del presente estudio se utilizó peróxido de hidrogeno comercial, adicional al etanol e hipoclorito de sodio; a pesar de que el material se recolectó de campo no hubo contaminación, lo que comprueba que las concentraciones y tiempo de exposición fueron adecuadas para el tejido usado.

Los medios de cultivo utilizados para micropropagación de *S. sempervirens* son los constituidos por sales minerales MS (Murashige & Skoog, 1962) y WS (Wolter & Skoog, 1966) formuladas para proliferación de callo en tabaco y fresno, respectivamente. Ambos medios de cultivo tienen concentraciones contrastantes de nitrato de amonio 20.61 mM y 0.62 mM, para MS y WS, respectivamente. El medio de cultivo (Tabla 2) para la multiplicación de secuoya contiene 39 % (8 mM) de la concentración de nitrato de amonio que posee el MS, con estas concentraciones se observaron resultados favorables para multiplicación y crecimiento (Tablas 2 y 4). La propuesta aquí referida es acorde a lo indicado por Zhang *et al.* (2019) quienes mencionan que no se requieren altas concentraciones de nitrógeno (60 mM en medio MS), ya que mucho de este elemento se desperdicia, estas cantidades se encuentran por encima de los requerimientos *in vitro* de muchas especies, mientras que el medio de cultivo propuesto solo tiene 12.38 mM de nitrógeno total, 1.81 mM de amonio y 10.57 mM de nitrato (Tabla 2). Por lo que es necesario dejar de generalizar el uso de sales MS para propagación *in vitro* de especies leñosas y es necesario realizar medios de cultivo de acuerdo a los requerimientos de cada especie. Otro aspecto a resaltar es la utilización de medio de cultivo para establecimiento (agua, azúcar comercial y agar), que sirve como filtro para eliminar explantes contaminados, sin desperdiciar nutrimentos y reguladores de crecimiento, ya que las sales minerales no son necesarias para el desarrollo de hongos y bacterias *in vitro* como se usa en microbiología.

La adición de reguladores de crecimiento es parte fundamental del cultivo *in vitro* dependiendo de la etapa, por ejemplo, el uso de auxinas está relacionado con inducción de enraizamiento y las citocininas con brotación. Para la multiplicación de secuoya se ha utilizado: 6-benciladenina (BA), 6-N-bencilaminopurina (BAP), thidiazurom (TDZ), N6-(2-isopentanol) adenina (2ip) kinetina y zeatina, con diferentes concentraciones y resultados (Whan Sul & Korban, 1994; Meneguzzi *et al.*, 2019; Rojas-Vargas *et al.*, 2021). Con las concentraciones de kinetina utilizadas, se determinó que sin citocinina en explantes apicales hubo mejor crecimiento en longitud (Fig. 3). Sin embargo, con 0.92  $\mu\text{M L}^{-1}$  de kinetina la eficiencia de brotes aptos para subcultivo fue 98%, y con concentraciones más altas disminuyó hasta 76% (Cuadro 4). El mayor crecimiento obtenido en el medio de cultivo sin kinetina muestra que esta especie no requiere este regulador, y que su presencia limita el crecimiento.

El crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro*, está determinado por los componentes del medio de cultivo como: concentración de nitrógeno (Molinos Da Silva *et al.*, 2004), fuente y concentración de carbono (Sato *et al.*, 2001); al igual que la absorción de nutrimentos (de



Oliveira *et al.*, 2010). Se ha estandarizado que el sub-cultivo de explantes debe realizarse cada cuatro semanas, porque estos disminuyen su crecimiento (Rios *et al.*, 2013). Se determinó con los resultados del pronóstico de crecimiento que los sub-cultivos en secuoya pueden ser cada siete semanas; sin embargo, se observó que a partir de la semana cinco el medio de cultivo comienza a deshidratarse pudiendo afectar el crecimiento de los explantes, por lo que se tomó como base hacer los subcultivos cada seis semanas.

La dinámica de crecimiento *in vitro* de secuoya (Fig. 3), puede estar asociada a la disponibilidad de nutrimentos, afectada por el pH del medio de cultivo (Chen *et al.*, 2015). Se ha comprobado que en condiciones *in vitro* la relación nitrato: amonio modifica el pH en el medio de cultivo, esto influye en la absorción nutrimental (Chen *et al.*, 2015; Singha *et al.*, 1987). En el presente trabajo no se determinó la oscilación de pH, pero probablemente las fluctuaciones en el crecimiento de los brotes de secuoya están asociados a la relación nitrato: amonio, donde los mayores crecimientos semanales pueden ser resultado de la forma de nitrógeno asimilable por la especie, además de las múltiples interacciones con el resto de los componentes del medio. No hay estudios en secuoya para conocer la forma de nitrógeno asimilable, fluctuaciones de pH, relación nitrato: amonio y su relación en la absorción con los nutrimentos del medio de cultivo.

Los tipos de explantes utilizados *in vitro* son: ápices apicales o laterales (Chen *et al.*, 2015), segmentos nodales (da Rocha *et al.*, 2015), de tallo más yema (Raya-Montaño, Villegas-Monter, & Arellano-Ostoa, 2009). Para secuoya se han utilizado secciones de tallo con yema apical (Whan Sul & Korban, 1994), propiciando solo crecimiento en longitud y tasa de multiplicación baja. De acuerdo a los resultados, el tipo de explante utilizado, apical o basal afectan la cantidad de brotes emitidos (Fig. 5). Los explantes basales presentan más brotes en promedio (2.11), debido a la pérdida de dominancia apical; ya que la concentración endógena de citocininas incrementa, favoreciendo el crecimiento de yemas laterales (Tanaka, Takei, Kojima, Sakakibara, & Mori, 2006; El-Sayed, Salama, Salim, & Taha, 2021) obtuvieron hasta 18 brotes por explante con 7.5 cm de longitud, dichos resultados son superiores a cualquier trabajo reportado en secuoya, sin embargo en dicho trabajo no se reporta la cantidad de brotes aptos, aspecto importante al momento de hacer cultivo de tejidos. Cabe mencionar que la presente metodología, el uso de fragmentos de tallos en cultivo *in vitro* para aumentar el número de brotes axilares para multiplicación se ha reportado es una opción viable que también se ha reportado en *Quercus robur* L. (Puddephat, Alderson, & Wright, 1997), *Pinus taeda* L. (Francisco de Oliveira, Ribas, Quoirin, Koehler, & Higa, 2011), *Calendula officinalis* L. (Victório, Lage, & Sato, 2012), *Selenicereus megalanthus* L., y *Hylocereus polyrhizus* L. (Suárez Román, Caetano, Ramírez, & Morales Osorio, 2014).

El esquema de propagación propuesto (Fig. 4), permite que la multiplicación de *S. sempervirens* sea eficiente. Los explantes apicales al alcanzar 5 cm de longitud, pueden ser fraccionados en apical, medio y basal, para aumentar la tasa de proliferación. Por otro lado, los explantes basales dan origen a segmentos apicales, debido a la elongación de yemas axilares. Aun cuando se determinó que brotes de 2 cm de longitud eran aptos (sin hiperhidratación) para continuar con el proceso de multiplicación, también se comprobó que secciones apicales y basales de 0.5 cm generan brotes con características deseables para dichos procesos. Es importante mencionar que, aunque el protocolo propuesto se estableció para secuoya, puede ser utilizado para otras especies leñosas, debido a que, al utilizar secciones de tallo sin yema apical, se puede propiciar la elongación de yemas axilares.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo de desinfección eficiente, sin necesidad de utilizar productos que puedan ser dañinos para el humano y el ambiente, esto a su vez permitió que la propuesta de multiplicación de *S. sempervirens* utilizando explantes apicales y basales tuviera éxito.

Respecto a las concentraciones de kinetina utilizadas, se demostró que secuoya tiene mayor crecimiento en longitud sin la adición de este regulador de crecimiento, caso contrario cuando se requiere obtener brotes con  $0.92 \mu\text{M L}^{-1}$  se promueve el desarrollo de brotes axilares en explantes basales. Respecto al medio de cultivo, con el propuesto en el presente trabajo, secuoya presentó buen crecimiento y brotación, por lo que puede sustituirse el medio de cultivo MS para esta especie.

## LITERATURA CITADA

- Ahuja, M. R. (2005). Polyploidy in gymnosperms: Revisited. *Silvae Genetica*, 54(2), 59–69. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0010>
- Chen, C.-C., Bates, R., & Carlson, J. (2015). Effect of environmental and cultural conditions in medium pH and plant growth performance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoot culture. *F1000Research*, 3(0), 1–16. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5919.1>
- Chen, L. R., Hsiung, T. C., Lin, K. H., Huang, T. Bin, Huang, M. Y., & Wakana, A. (2017). Supplementary effect of hydrogen peroxide as a pre-disinfectant for sterilizing rhizome bud explants of *Zantedeschia aethiopica* L. with Chlorine Dioxide. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 62(1), 81–86. <https://doi.org/10.5109/1799306>
- Clapa, D., Fira, A., Hărășan, E., Chiș, L., Roman, G., & Cantor, M. (2010). *Sequoia sempervirens* in Transylvania. *Acta Horticulturae*, 885(October 2017), 85–90. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.11>
- da Rocha, P. S. G., de Oliveira, R. P., & Scivittaro, W. B. (2015). New light sources for *in-vitro* potato micropropagation. *Bioscience Journal*, 31(5), 1312–1318. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n5a2015-26601>
- Davies, N. T., Wu, H. F., & Altaner, C. M. (2014). The chemistry and bioactivity of various heartwood extracts from redwood (*Sequoia sempervirens*) against two species of fungi. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 44(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40490-014-0017-4>
- de Oliveira, L. M., Paiva, R., Ferreira de Santana, Raniere, J., Pereira, F. D., Nogueira, R. C., & Silva, L. C. (2010). Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. *Ciencia e Agrotecnologia*, 34(6), 1439–1445. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542010000600012>
- El-kadder, E. M. A., & Fathy, H. (2012). Production of Indole Acetic Acid from *Sequoia sempervirens* and its Reuse Under *In vitro* Culture. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(2), 167–173.
- El-Sayed, I. M., Salama, W. H., Salim, R. G., & Taha, L. S. (2021). Relevance of Nanoparticles on Micropropagation, Antioxidant Activity and Molecular Characterization of *Sequoia sempervirens* L. Plant. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 14(2), 374–382. <https://doi.org/10.54319/jjbs/140225>
- Francisco de Oliveira, L., Ribas, L. L. F., Quoirin, M., Koehler, H. S., & Higa, A. R. (2011). Micropropagation of *Pinus taeda* L. via axillary buds. *BMC Proceedings*, 5(P144), 1–3. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-s7-p144>
- Hill, K., & Schaller, G. E. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture: A molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signaling and Behavior*, 8(10). <https://doi.org/10.4161/psb.25709>
- Liu, C., Xia, X., Yin, W., Huang, L., & Zhou, J. (2006). Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). *Plant Cell Reports*, 25(7), 621–628. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0120-y>
- Meneguzzi, A., Konzen, E. R., Navroski, M. C., Camargo, S. S., Pereira, M. D. O., Rufato, L., & Lovatel, Q. C. (2019). Shoot multiplication of two *Sequoia sempervirens* genotypes with addition of small concentrations of kinetin. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 39(1). <https://doi.org/10.4336/2019.pfb.39e201701550>

- Molinos Da Silva, C., Villegas Monter, Á., Sánchez García, P., Alcántar González, G., Rodríguez Mendoza, M. N., & Ruíz Posadas, L. del M. (2004). Efectos del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de  $Ca^{2+} + Y K^{+}$ , producción de biomasa y necrosis apical de vid R110. *Inter ciencia*, 29(7), 384–388.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00179-0)
- Olson, D. F., Roy, D. F., & Walters, G. A. (1990). *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. In R. M. Barnes & B. H. Honkala (Eds.), *Silvics of North America. Agriculture handbook 654* (pp. 541–551). Washington, DC, USA: USDA Forest Service.
- Ozudogru, E. A., Kirdok, E., Kaya, E., Capuana, M., De Carlo, A., & Engelmann, F. (2011). Medium-term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro shoot cultures and encapsulated buds. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.10.013>
- Pereira, M. de O., Angelo, A. C., Navroski, M. C., Dobner Júnior, M., & De Oliveira, L. M. (2017). Resgate vegetativo e enraizamento de estacas de diferentes matrizes de *Sequoia sempervirens*. *Cerne*, 23(4), 435–444. <https://doi.org/10.1590/01047760201723042452>
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Puddephat, I. J., Alderson, P. G., & Wright, N. A. (1997). Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 48(309), 951–962. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.4.951>
- Raya-Montaña, Y. A., Villegas-Monter, A., & Arellano-Ostoa, G. (2009). Cinética de enraizamiento in vitro de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 111–117.
- Ribeiro, J. M., Teixeira, S. L., & Bastos, D. C. (2011). Cultivo in vitro de *Sequoia sempervirens* L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. *Ciência Florestal*, 21(1), 77–82.
- Rios, G., Añez, N., Ramírez, M., Bracho, B., Araujo, D., Suárez, H., & Nava, J. (2013). Cultivo in vitro de yemas, tratadas con benciladenina, provenientes de cormos enteros o seccionados de plátano “Cambur manzano.” *Bioagro*, 25(2), 137–142.
- Rojas Vargas, A., Castander-Olarieta, A., Moncaleán, P., & Montalbán, I. A. (2021). Optimization of the micropropagation of elite adult trees of *Sequoia sempervirens*: Forest species of interest in the Basque Country, Spain. *Revista Bionatura*, 6(1), 1511–1519. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.01.01.11>
- Sato, A. Y., Pereira Pinto, J. E., Morais, A. R. De, Lameira, O. A., & de Castro, N. E. (2001). Efeito de diferentes níveis de nitrogênio, em presença ou ausência de benzilaminopurina, na multiplicação de gerbera (*Gerbera* sp.) de vaso. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 25(5), 1071–1078.
- Singha, S., Oberly, G. H., & Townsend, E. C. (1987). Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11(3), 209–220. <https://doi.org/10.1007/BF00040426>
- Suárez Román, R. S., Caetano, C. M., Ramírez, H., & Morales Osorio, J. G. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronomica*, 63(3), 1–14. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.40980>
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., & Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant Journal*, 45(6), 1028–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02656.x>
- Toral Ibañez, M., Caru, M., Herrera, M. A., Gonzalez, L., Martin, L. M., Miranda, J., & Navarro-Cerrillo, R. M. (2009). Clones identification of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. in Chile by using PCR-RAPDs technique. *Journal of Zhejiang University*:

**Recibido:**  
28/marzo/2022

**Aceptado:**  
12/enero/2023

- Science B*, 10(2), 112–119. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820162>
- Victório, C. P., Lage, C. L. S., & Sato, A. (2012). Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. *Revista Ciencia Agronomica*, 43(3), 539–545. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000300017>
- Whan Sul, I., & Korban, S. S. (1994). Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(3), 131–135. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1ffjkd5.19>
- Wolter, K. E., & Skoog, F. (1966). Nutritional Requirements of *Fraxinus* Callus Cultures. *American Journal of Botany*, 53(3), 263–269. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1966.tb07333.x>
- Zhang, K., Wu, Y., & Hang, H. (2019). Differential contributions of  $\text{NO}^3/\text{NH}^{4+}$  to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species *in vitro*. *Plant Methods*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0473-1>