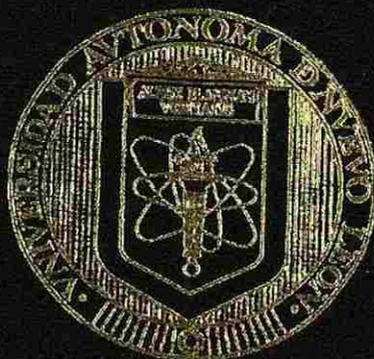


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACION *in vitro* DEL PINON AZUL

Pinus maximartinezii (Rzed.)

POR

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biotecnología

DICIEMBRE DEL 2007

TD
Z5320
FCB
2007
.033

RECUPERACION in vitro

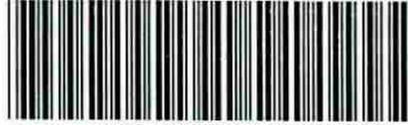
DEL PINON AZUL

Pinus maximartinezii

(Rzed)

M.C.O.Z.

2007



1020160698



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

Por

UANL

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

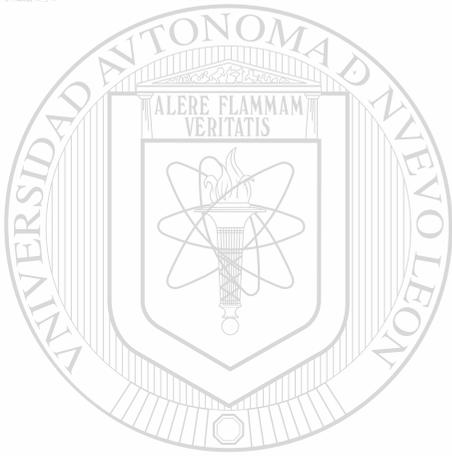
con Especialidad en Biotecnología

Diciembre de 2007

1464159



TD
Z5320
FCC
2007
•O33



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4- Septiembre .08
Secretaría de B. y I.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

Por

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



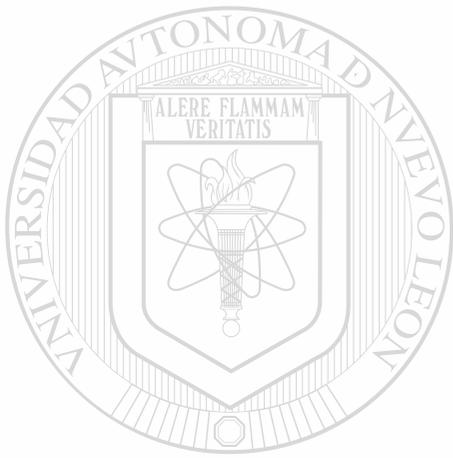
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biotecnología

Diciembre de 2007



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Con Especialidad en Biotecnología

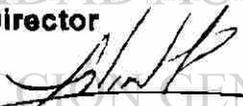
Presenta

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

COMISIÓN DE TESIS


Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Director

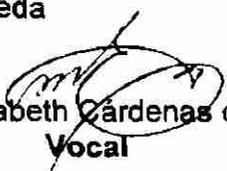

Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Director externo


Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos
Secretario


Dra. María Julia Verde Star
Vocal


Dra. Teresa Elizabeth Torres Cepeda
Vocal


Dr. Benito Pereyra Alferez
Vocal


Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L.

Diciembre 2007

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera, intervinieron en la realización de esta investigación.

Al Instituto Tecnológico de Nuevo León por el apoyo otorgado y las facilidades brindadas para la realización de mis estudios doctorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca para la realización del programa doctoral.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, asesor principal, de la presente investigación. Por su confianza y apoyo brindado en la realización de esta investigación, así como su valiosa dirección en el desarrollo del trabajo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A los siguientes Doctores integrantes de mi comité de tesis, Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos, Dra. María Julia Verde Star, Dra. Teresa Elizabeth Torres Cepeda y Dr. Benito Pereyra Alférez, por su participación en la revisión y sugerencias aportadas al presente trabajo.

Al Dr. Luís Galán Wong por sus sugerencias y apoyo durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A la Dra. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda, por su valiosa dirección en el desarrollo de la presente investigación, además, por su confianza y apoyo siempre brindado, y agradecerle infinitamente haberme compartido sus conocimientos relacionados con el cultivo de tejidos vegetales; los cuales han sido de gran utilidad en el desarrollo de mi vida profesional.

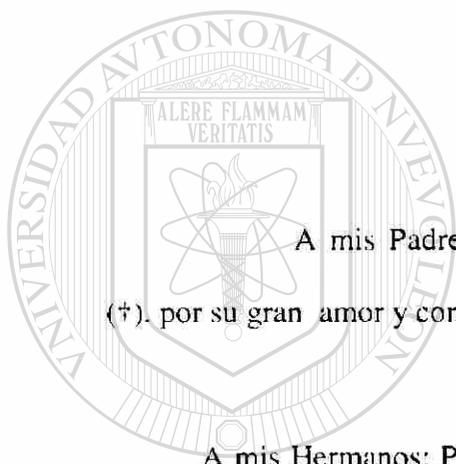
Al Ph.D. Emilio Olivares Sáenz, por la asesoría brindada en la interpretación de los análisis estadísticos de la presente investigación y sus acertadas recomendaciones.

Al M.C. Raúl Porfirio Salazar Sáenz por las facilidades brindadas para la realización del trabajo en el laboratorio a su cargo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Ing Isaac Quintero Quintero por su valiosa colaboración en la donación del germoplasma vegetal, para la realización de esta investigación. Así como, por su disponibilidad en los recorridos de campo al lugar de origen de la especie.

Al M.C. Raúl René Ruíz Garduño, por su colaboración incondicional en la gestión de las visitas y los recorridos de campo al cerro piñones.

DEDICATORIAS



A mis Padres, Margarita Zacarías de Ojeda y Juan Isaías Ojeda Lázaro
(†), por su gran amor y comprensión.

A mis Hermanos; Por el apoyo moral, que siempre me han brindado. Así como

a todos mis sobrinos por ser la alegría de la familia.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

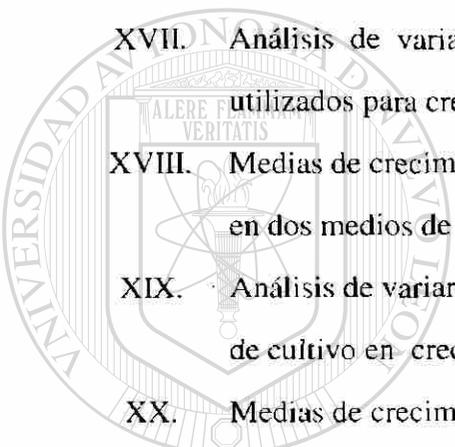


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I.	Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD..... 37
II.	Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD..... 38
III.	Tratamientos a los que se sometieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de <i>Pinus maximartinezii</i> para estudiar su respuesta <i>in vitro</i> en las diferentes etapas..... 42
IV.	Componentes inorgánicos de los medios DCR, GD, MS y SH..... 45
V.	Número de yemas promedio de <i>Pinus maximartinezii</i> que presentaron 2 primordios foliares a las seis semanas en la etapa de alargamiento..... 52
VI.	Análisis de varianza para la variable número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i> 53
VII.	Análisis de varianza para la variable longitud de brotes obtenidos a las 8 semanas en la triple interacción en <i>Pinus maximartinezii</i> 56
VIII.	Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable longitud de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> 56
IX.	Análisis de varianza de la variable capacidad de formación de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas..... 57
X.	Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable capacidad de formación de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> 58
XI.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces en los medios DCR y GD..... 60
XII.	Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de medios de cultivo en cuanto al número de raíces formados en <i>Pinus maximartinezii</i> 60

XIII.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que no formaron raíz, con una raíz y dos raíces con diferentes concentraciones de sales minerales.	61
XIV.	Prueba de Ji-cuadrada para comparación de concentraciones de medios en cuanto al número de raíces formadas en <i>Pinus maximartinezii</i>	61
XV.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que formaron raíz, con una raíz y con dos raíces expuestos a tres tiempos de pulso.....	62
XVI.	Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de tres tiempos de pulso en <i>Pinus maximartinezii</i>	62
XVII.	Análisis de varianza para la comparación de medios de cultivo utilizados para crecimiento de raíz <i>in vitro</i> de <i>Pinus maximartinezii</i>	64
XVIII.	Medias de crecimiento de raíz (mm) de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidas en dos medios de cultivo a las 8 semanas del cultivo <i>in vitro</i>	64
XIX.	Análisis de varianza para la comparación de concentraciones en medios de cultivo en crecimiento de raíz de <i>Pinus maximartinezii in vitro</i>	64
XX.	Medias de crecimiento de raíz (mm) de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidas en dos concentraciones de medios de cultivo a las 8 semanas del cultivo <i>in vitro</i>	65
XXI.	Análisis de varianza para la comparación de tiempos al pulso en cuanto al crecimiento de raíz en <i>Pinus maximartinezii</i>	65
XXII.	Medios de crecimiento de raíz (mm) en tres tiempos de exposición al pulso en <i>Pinus maximartinezii</i>	65



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

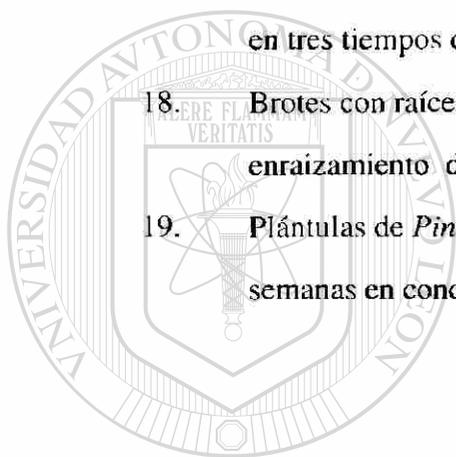
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Material vegetal de <i>Pinus maximartinezii</i>	32
2.	Semillas maduras de <i>Pinus maximartinezii</i> en estratificación.....	32
3.	Proceso de desinfección de las semillas de <i>Pinus maximartinezii</i> ...	35
4.	Obtención de embrión maduro a partir del megagametofito de <i>Pinus maximartinezii</i>	36
5.	Obtención de cotiledones de <i>Pinus maximartinezii</i> a partir de embrión maduro.....	36
6.	Unidades del experimento en condiciones controladas.....	39
7.	Brotos enraizados <i>in vitro</i>	47
8.	Plantas aclimatadas de <i>Pinus maximartinezii</i> después de 8 semanas del establecimiento en esta etapa.....	48
9.	Respuesta observada en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Pinus maximartinezii</i>	50
10.	Formación de estructuras nodulares en embriones cigóticos y cotiledones de <i>Pinus maximartinezii</i> a las 6 semanas de la transferencia <i>in vitro</i>	51
11.	Alargamiento de yemas en embriones cigóticos y cotiledones de <i>pinus maximartinezii</i> a las 2, 4 y 6 semanas de la transferencia en los medios de cultivo.....	52
12.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i> en los medios DCR y GD.....	54

13.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i> en dos concentraciones de BAP.....	55
14.	Proceso de formación de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> a las 8 semanas de cultivo.....	58
15.	Respuesta de los brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> a las 8 semanas en medios de cultivo para promover enraizamiento <i>in vitro</i>	59
16.	Brotes de <i>Pinus maximartinezii</i>	59
17.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que formaron raíces en tres tiempos de exposición al pulso.....	63
18.	Brotes con raíces después de 8 semanas en los medios de enraizamiento de <i>Pinus maximartinezii</i>	66
19.	Plántulas de <i>Pinus maximartinezii</i> aclimatadas después de 8 semanas en condiciones controladas y de invernadero.....	67



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

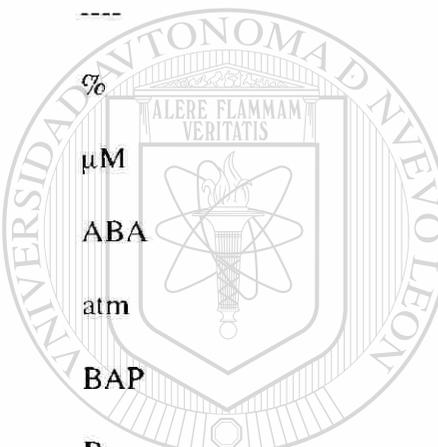
Sección	página
AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCION.....	1
2. IPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivos particulares.....	3
<hr style="border: 1px solid black;"/> 4. ANTECEDENTES.....	<hr style="border: 1px solid black;"/> 4
4.1 Importancia económica de las Pináceas.....	4
4.2 Características de las Pináceas.....	5
4.3 Distribución Geográfica.....	5
4.4 Clasificación Botánica de la Especies.....	6
4.5 Historia y origen del <i>Pinus maximartinezii</i> (Rzedowski).....	7
4.6 Descripción botánica de la especie.....	7
4.7 Importancia económica de la especie en estudio.....	8
4.8 Importancia mundial de la diversidad genética.....	9
4.9 Impacto de la biotecnología vegetal.....	11
4.10 Propagación de las pináceas.....	11
4.11 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales en coníferas.....	12

4.12	Micropropagación en coníferas.....	13
4.13	Factores que influyen en la respuesta <i>in vitro</i>	14
4.13.1.	Luz.....	14
4.13.2	Especie.....	15
4.13.3	Inóculo o explante.....	16
4.13.4	Influencia de la sacarosa en el medio de cultivo.....	17
4.13.5	Medio de cultivo.....	18
4.13.5.1	Efectos de las sales inorgánicas en la respuesta <i>in vitro</i>	18
4.13.5.2	Respuesta a los reguladores de crecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	19
4.13.5.3	Organogénesis en coníferas.....	20
4.13.5.3.1	Etapas de la ruta Organogénética en coníferas...	21
5.	MÉTODOS.....	31
5.1	Material vegetal.....	31
5.1.1	Estratificación de la semilla.....	32
5.1.2	Desinfección de la Semilla.....	33
5.1.3	Desinfección de lo megagametogitos.....	34
5.1.4	Explante o inóculo.....	35
5.2	Medios de cultivo.....	36
5.3	Condiciones controladas del cultivo <i>in vitro</i>	38
5.4	Modelo estadístico.....	39
5.5	Etapas de la organogénesis.....	40
5.5.1	Etapa de establecimiento aséptico.....	40
5.5.2	Etapa de inducción de primordios yemas.....	41
5.5.3	Etapa de alargamiento de yemas.....	42
5.5.4	Etapa de formación de brotes.....	43
5.5.5	Etapa de enraizamiento de brotes.....	44
5.5.5.1	Enraizamiento <i>in vitro</i>	44
5.5.5.2	Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	46

5.5.6 Aclimatación de las plantas.....	48
6. RESULTADOS	49
6.1 Variables evaluadas en la etapas de organogénesis.....	49
6.1.1 Establecimiento aséptico de los explantes.....	49
6.1.2 Inducción de primordios de yemas	50
6.1.3 Alargamiento de yemas	51
6.1.4 Formación de brotes	53
6.1.5 Longitud de brotes.....	55
6.1.6 Capacidad de formación de brotes.....	57
6.1.7 Enraizamiento de brotes	58
6.1.7.1 Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	66
6.1.8 Aclimatación de plantas.....	67
7. DISCUSIÓN.....	68
7.1 Establecimiento aséptico de los explantes.....	68
7.2 Inducción de primordios de yemas.....	68
7.3 Alargamiento de yemas.....	70
7.4 Formación de brotes.....	71
7.5 Longitud de brotes.....	72
7.6 Capacidad de formación de brotes	73
7.7 Enraizamiento de brotes <i>in vitro</i>	73
7.8 Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	75
7.9 Aclimatación de plantas	75
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	77
LITERATURA CITADA.....	79
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	89

LISTA DE SÍMBOLOS

NOMENCLATURA



----	Sin valor
%	Porcentaje
μM	Micro molar
ABA	Ácido absceísico
atm	Atmósfera
BAP	Bencilaminopurina
B ₅	Tambor <i>et al.</i> , (1965)
CM	Cuadrado medio del error
Cm	Centímetros
°C	Grados centígrados
DCR	Gupta y Durzan (1885)
DOF	Diario Oficial de la Federación
E R	Erison (1965)
F	F- calculada
FV	Fuentes de variación
g	Gramos

g/l Gramos por litro

GD Gresshoff y Doy (1972)

GL Grados de libertad

h Horas

(H₂O₂) Peróxido de hidrógeno

Ha Hectáreas

HE Hellers (1953)

IBA Ácido indolbutírico

Kg Kilogramos

M Metros

mgl Miligramos por litro

min Minutos

ml Mililitros

mM Mili molar

mm Milímetros

MS Murashige y Skoog (1962)

msnm Metros sobre el nivel del mar

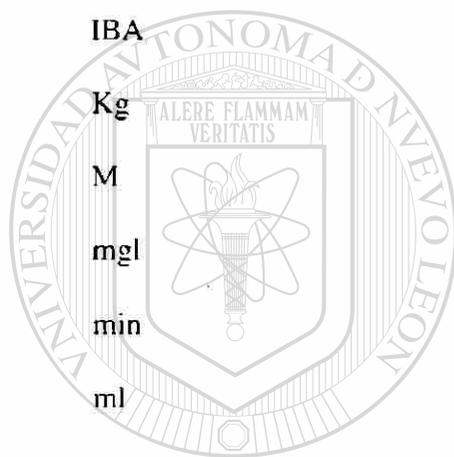
NAA Ácido naftalenacético

NaOCl Hipoclorito de sodio

SC Suma de cuadrados

seg Segundos

SEMARNAT Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales



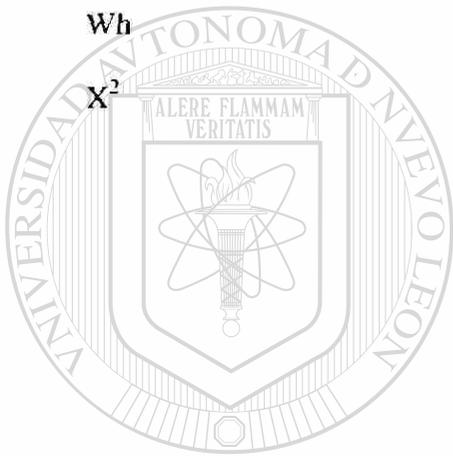
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



SH	Schenk y Hildebrand (1972)
Sig	Significan cía
SPSS	<i>Statistical Products for Social Sciences</i>
TE	Tang y Ouyang (1999)
Tween-20	Poliexietileno sorbitan monolaurato
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
(v/v)	Volumen sobre volumen
Wh	Whiter (1943)
χ^2	Ji- cuadrada



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Pinus maximartinezii (Rzedowski) es una especie endémica de pino en peligro de extinción, confinada a una población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en una superficie de 400 ha. al sur de Zacatecas, México. El éxito del cultivo de tejidos vegetales para conservación de germoplasma, depende fundamentalmente de la tasa de regeneración. En base a esto se planteó como objetivo desarrollar un protocolo para la micropropagación de *Pinus maximartinezii* mediante la técnica de organogénesis. En la etapa de inducción de yemas fueron cultivados embriones cigóticos y cotiledones en los medios de cultivo DCR y GD adicionados con 0.3 mg l⁻¹ ó 0.5 mg l⁻¹ de BAP; 0.01 mg l⁻¹ de ANA y vitaminas. Los explantes fueron cultivados a 26 °C bajo un fotoperiodo de 16 h. Los explantes fueron transferidos cada 15 días a los mismos medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento durante 6 semanas, para el desarrollo de brotes. El análisis fue un factorial 2³ con 8 repeticiones. La variable evaluada fue el número de explantes que formaron yemas. Después de la inducción de yemas, los explantes fueron transferidos a los medios básicos sin hormonas, adicionados con 0.1 % de carbón activado. Se evaluó el número de brotes por embrión, capacidad de formación de brotes y longitud de brotes a las 8 semanas del cultivo. Se seleccionaron brotes de 10 mm que fueron utilizados en diversos medios de enraizamiento. Se encontró diferencia significativa entre medios de cultivo, concentración de reguladores de crecimiento y capacidad de formación de brotes. La máxima frecuencia de formación de brotes se presentó en el medio DCR adicionado con 0.5 mg l⁻¹ BAP y 0.01 mg l⁻¹ de ANA. La frecuencia más alta de inducción de raíces *in vitro* fue de 17 % en el tratamiento de 24 h de pulso y 23 % con la inoculación de hongos micorrízicos *in vivo*.

Abreviaturas: BAP= Bencilaminopurina; ANA= Acido Naftalenacético; DCR= (Gupta y Durzan 1985); GD= (Gresshoff y Doy, 1972); mg l⁻¹ =miligramos por litro, h =horas.

ABSTRACT

Pinus maximartinezii (Rzedowski) is an endemic species of pine endangered, confined to a single population of approximately 2000 to 2500 mature trees, covers about 400 ha in southern Zacatecas, Mexico. The success of tissue culture techniques for germplasm preservation depends fundamentally on rate of regeneration. The objective of this study was to achieve an *in vitro* proliferation protocol of *Pinus maximartinezii* using organogenesis technique. For bud induction stage, isolated cotyledons and zygotic embryos were cultured on DCR and GD media, supplemented with 0.3 or 0.5 mg l⁻¹ BAP; 0.01 mg l⁻¹ NAA and vitamin solution. Explants were incubated at 26 °C under a 16 h photoperiod. The explants were transferred every 15 days to hormone-free medium (DCR and GD) for a period of 6 wk for development of shoots. The statistical analysis was a factorial 2³ with 8 replications. The parameter evaluated was the number of explants forming buds. After induction of buds, the explants were transferred to hormone-free basal medium to which 0.1% activated charcoal was added. After 8 wk were evaluated the number of shoots per embryo, shoot formation capacity index and length of shoots. Elongated shoots (10 mm length) were exposed to several root initiation media. Basal media, plant growth regulators concentration and shoot formation capacity index were significantly different. The maximum frequency of shoot formation occurred on DCR medium containing 0.5 mg l⁻¹ BAP and 0.01 mg l⁻¹ NAA. The highest root induction frequency was 17% on 24 h pulse treatment and 23 % with *in vivo* mycorrhizal fungi.

Abbreviation: BAP= bencil amino purine; NAA= Naftalen acetic acid; DCR= Gupta & Durzan, 1985; GD= Gresshoft & Doy, 1972; mg l⁻¹= milligrams by liter; h= hours.

1. INTRODUCCIÓN

México es un País con una gran riqueza forestal y se considera que es centro de origen de las pináceas. El género *Pinus* es el mas importante de las coníferas, uno de los centros de diversidad se encuentra en México, con alrededor de 60 especies.

El piñón azul o maxi piñón *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica que ha sobrevivido a una restricción genética extrema y se considera el más raro de los pinos piñoneros ya que esta confinado a pequeños rodales de una sola población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros que cubren cerca de 400 ha; Se localiza entre 1600 y 2250 m. de altitud sobre una mesa llamada Cerro Piñones la cual está en el extremo sur de la Sierra de Morones en el estado de Zacatecas, México.

La regeneración de la especie es muy escasa o prácticamente inexistente, debido a que las semillas son utilizadas como alimento y la cosecha se realiza cortando las ramas con machete, y esto reduce el número de yemas para futuros brotes por lo tanto, se disminuye su producción natural, además el árbol tiene una corteza muy delgada y es muy susceptible al fuego.

Las coníferas son propagadas tradicionalmente a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. Sin embargo en los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente, puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas tales como la clonación, cultivo de células haploides, formación de embriones somáticos entre otras. Estas técnicas han demostrado ser efectivas en la multiplicación, mejoramiento y conservación de plantas; específicamente juegan un papel muy importante en la conservación de especies en peligro de extinción.

La propagación *in vitro* más utilizada en coníferas es la organogénesis y la embriogénesis somática; en cualquiera de los casos, la regeneración de plantas requiere de varias etapas que deben ser determinadas empíricamente; puesto que existen una serie de factores que influyen para lograr una respuesta exitosa. Entre estos factores se encuentran: Luz, Especie, Tipo de explante, Sacarosa, Medio de cultivo entre otros más.

Por lo anterior, en el presente trabajo se desarrollo un protocolo para la micropropagación masiva *in vitro* de *Pinus maximartinezii*.

En esta etapa de la organogénesis, los explantes se siguen manteniendo en un medio sin reguladores de crecimiento. Generalmente las yemas adventicias formadas son separadas del explante original ya que el crecimiento de los brotes aislados puede ser estimulado por la dilución del medio básico: adición de carbón activado y en ocasiones disminución de sacarosa; (Lu *et al.*, 1991; Harry y Thorpe, 1994; Sen *et al.*, 1994; Saborio, 1996; Capuana, 2001). Por su parte, Zhang *et al.* (2006) mencionan que para la formación de brotes de alta calidad es indispensable la transferencia subsecuente de yemas de *Pinus massoniana* a medios de cultivo con concentraciones más bajas de reguladores de crecimiento.

c) Multiplicación de brotes.

La función de esta etapa es incrementar el número de primordios foliares *in vitro*. La formación de brotes a partir de primordios foliares requiere del subcultivo a otro medio con diferente equilibrio nutritivo y hormonal.

Una vez concluida la fase de alargamiento de yemas, los brotes son subcultivados a medios de cultivo que pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento como BA y Zeatina para probar su habilidad en producir brotes axilares (Lambardi *et al.*, 1993). El número de brotes axilares fue el mejor parámetro para evaluar el efecto de NAA y BA en la proliferación de *Thuja occidentalis*. La multiplicación de brotes fue mejor con 10µM BA y 0.1µM NAA (Burkhart, 1991). En otra investigación trabajando con *Pinus taeda*, se obtuvo un promedio de 20 brotes/semilla en un periodo de 10 semanas (Niella

y Rocha, 2001). En el caso de *Sequoia sempervirens*, Sul logró establecer en 1995, la proliferación *in vitro* de más de 20 brotes por explante. En un trabajo más reciente, pero con *Pinus ayacahuite*, se han llegado a formar hasta 50 a 60 brotes/semilla (Saborio, 1996).

d) Enraizamiento.

En angiospermas arbóreas el enraizamiento *in vitro* ha mostrado ser relativamente simple, mientras que en gimnospermas se ha presentado muy problemático (Selby y Seaby, 1982). Aunque la producción de yemas adventicias *in vitro* ha sido exitosa, con frecuencia existe dificultad en el enraizamiento; (Capuana, 2001) logró la multiplicación de brotes de *Pinus cembra* y *Pinus pinea*, sin embargo, el enraizamiento fue difícil de obtener. Por su parte, Mc Keand y Allen (1984) han consignado anomalías en el sistema radical de *Pinus taeda*.

Ocasionalmente los brotes adventicios pueden formar raíces espontáneamente, pero el enraizamiento es mayormente estimulado con la adición de IBA al medio Von Arnold y Ericsson, 1981 o ANA, AIA y BAP (Mott y Amerson, 1981). Se reporta que la auxina que más se utiliza es el IBA en concentraciones de 0.1 a 10 mg l⁻¹; o bien el someter los tejidos a altas concentraciones de auxinas por varias horas (pulso) y en ocasiones la combinación de algunas citocininas (Kin, Zeatina, BAP) a razón de 0.01 - 0.1 mg l⁻¹, benefician la formación de raíces (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe, 2004).

La inducción de raíces se ha obtenido también a través del co-cultivo de los brotes con *Agrobacterium* (Saborío, 1996); y mediante la inoculación con hongos ectomicorrizicos (Oliveira *et al.*, 2003). Generalmente los brotes que alcanzan entre 15 y 30 mm son sometidos a tratamientos de pulso con IBA a razón de 1 μ M y 10 μ M de NAA (Harry y Thorpe, 1994). Brotes de *Picea rubens* fueron sometidos a un tratamiento de pulso IBA/NAA. 17% de los brotes formaron raíces después del tratamiento con 0.1mM IAA + 0.1 mM IBA por 24h; y solo el 11% se obtuvo con 2.5 mM IBA + 2.5 mM NAA. El tratamiento más efectivo para enraizamiento fue el de 4 h de pulso en 1.0 mM IBA + 10 mM NAA a un pH de 4.5, en el medio GD al 50% de su concentración; sacarosa 1-2% y 0.3% gelrite (Chin Yi *et al.*, 1991).

Por otro lado, Hargreaves *et al.* (2004), aplicaron durante 10 días un tratamiento en el medio GD adicionado con 0.5 mg l^{-1} NAA y 1.0 mg l^{-1} de IBA, a brotes de *Pinus radiata*. Después de 13 a 18 semanas, se obtuvo un promedio de 65 a 74 % de enraizamiento. Posteriormente, estos mismos investigadores (Hargreaves *et al.*, 2005) observaron que en general, los brotes provenientes de cotiledones mostraron una tendencia a tener menos raíces que los provenientes de embrión.

Tang y colaboradores (2004a) han encontrado que la adición de antioxidantes mejora el enraizamiento de brotes de *Pinus virginiana* en una proporción de 19 %. Estos investigadores concluyeron que los antioxidantes redujeron e inhibieron la oxidación y la necrosis, al reducir la acumulación de peroxidasa.

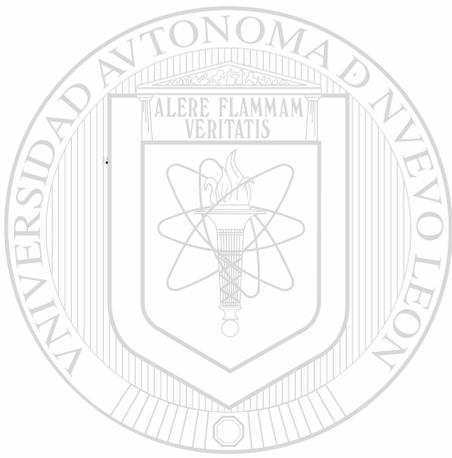
c) Aclimatación

El estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia de las plántulas obtenidas *in vitro*; por lo que se recomienda, hacer uso de un invernadero o una cámara de crecimiento adecuado para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva bajo condiciones *ex vitro* (Pierik, 1990a).

La técnica *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las plantas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Nairn (1992), consignó un enraizamiento *ex vitro* entre 5 a 85 % en *Pinus radiata*.

En 1982 Selby y Seaby observaron que plántulas de *Pinus contorta* desarrollaron un gran número de raíces laterales primarias en un sustrato humedecido con auxinas. Lo que disminuyó así, la inestabilidad de las plántulas transplantadas. En *Pinus halepensis* los brotes utilizados en la etapa de enraizamiento, fueron transferidos directamente a macetas que contenían mezcla de turba y vermiculita en proporciones de 1:1 y regados con agua corriente. Las macetas se mantuvieron con una humedad relativa de 70% por 3 a 4 semanas y después transferidos al invernadero (Lambardi *et al.*, 1993). Para *Pinus radiata*, Hargreaves *et al.* (2005) han transferido los brotes a charolas conteniendo una

mezcla de 1:1:1 de turba, perlita y arena. Los brotes se mantuvieron bajo condiciones de luz y temperatura similares a aquellos que crecieron *in vitro*; después de una semana los brotes fueron gradualmente endurecidos para llevarlos a condiciones de humedad ambiental ($60 \pm 10\%$), al transcurrir cuatro semanas del establecimiento los brotes fueron monitoreados y sembrados en charolas plásticas con la misma mezcla utilizada anteriormente; con la adición de 5gl^{-1} de osmocote y transferidas al invernadero por un lapso de 8 semanas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. MÉTODOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de Febrero de 2004 a Julio de 2007.

5.1 Material vegetal.

Pinus maximartinezii (Rzedowski) es una especie endémica en peligro de extinción que únicamente se desarrolla en estado natural en el "cerro de piñones"; se encuentra en grupos o de manera aislada con individuos de porte variable que no superan los 12 metros de altura, en el municipio de Juchipila, Zacatecas, México. (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002). Semillas maduras de *Pinus maximartinezii* fueron colectadas de árboles seleccionados en su hábitat natural en octubre y noviembre del 2003 (Figura 1).



Figura 1. Material vegetal de *Pinus maximartinezii*. A, conos en desarrollo; B, cono maduro; C, Semillas maduras.

5.1.1 Estratificación de la semilla.

Con la finalidad de eliminar los agentes contaminantes, las semillas fueron cepilladas y lavadas con detergente en agua corriente durante 5 min y posteriormente,

fueron colocadas en una mezcla estéril de perlita y arena (1:1) y colocadas a 5 °C por 40 días (Figura 2).



Figura 2. Semillas maduras de *Pinus maximartinezii* en estratificación.

5.1.2 Desinfección de la semilla.

La asepsia de los inóculos utilizados es imprescindible para el éxito en cultivo de tejidos vegetales. La mayoría de las especies presentan contaminantes superficiales o incluso patógenos endógenos que, de no eliminarse, provocan la pérdida total de los explantes.

Por lo expuesto anteriormente y con el objeto de eliminar los contaminantes superficiales, las semillas intactas previamente estratificadas se sometieron a un proceso de predesinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6% de ingrediente activo (Cloralex)^{MR} adicionado con 2 g de detergente comercial. En esta solución las semillas permanecieron 5 min. Posteriormente, las semillas fueron cepilladas nuevamente y enjuagadas con agua corriente permaneciendo por un lapso de 24h en estas condiciones (Figura 3a).

Una vez concluida la predesinfección, se seleccionaron únicamente semillas que presentaban dimensiones uniformes, siendo en promedio de 2.0 a 2.5 cm de largo; procediéndose a eliminar las testas, utilizando un martillo para romperlas y extrayendo el megagametofito intacto, para ser utilizado en el establecimiento *in vitro* (Figura 3b).

5.1.3 Desinfección de los megagametofitos.

La desinfección se realiza con la finalidad de evitar las contaminaciones con microorganismos, esto es un aspecto básico que se debe considerar para el éxito del establecimiento *in vitro* de los inóculos y de todas las etapas siguientes de los explantes.

El proceso de desinfección se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar (Alder^{MR}). los megagametofitos fueron colocadas por 45 min en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 12.5 volúmenes y en agitación continua. Con el propósito de eliminar el exceso de agente desinfectante, el material fue sometido a tres enjuagues con agua esterilizada.

Después los megagametofitos se transfirieron a etanol al 70% (v/v) durante 1 min realizándose un enjuague con agua esterilizada durante 5 min y en agitación. Posteriormente los megagametofitos se colocaron durante 5 min en una solución al 15% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (6% de ingrediente activo); adicionado con 0.5 ml de poliexietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) seguido de 3 enjuagues con agua esterilizada por 5, 10 y 15 min respectivamente y en agitación (Figura 3c).



Figura 3 Proceso de desinfección de las semillas de *Pinus maximartinezii*. A, Predesinfección de la semilla; B, Escarificación de la semilla; C, Desinfección de los megagametofitos; D, Megagametofitos asépticos.

5.1.4 Explante o inóculo

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta. La elección de un explante apropiado contribuye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski 1991).

En el presente estudio se utilizaron como fuente de inóculo dos tipos de explante: cotiledones disectados de embriones maduros y embriones cigóticos obtenidos de megagametofitos (Figura 3d).

El proceso de extracción de los explantes se realizó utilizando pinza y bisturí en la campana de flujo laminar sobre cajas petri esterilizadas (Figura 4 y 5).

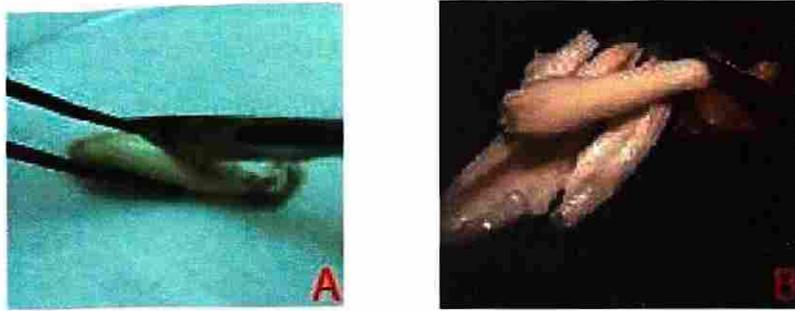


Figura 4. Obtención de embrión maduro a partir del megagametofito de *Pinus maximartinezii*. A, Megagametofito maduro completo; B, Extracción del embrión maduro.



Figura 5. Obtención de cotiledones de *Pinus maximartinezii* a partir de embrión maduro. A, Embrión maduro; B, Cotiledones disectados.

5.2 Medios de cultivo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio de cultivo apropiado, donde hay que considerar no sólo sus componentes sino, su preparación. En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante y sustancias reguladoras de crecimiento entre otros compuestos.

Los medios seleccionados para el cultivo *in vitro* de esta especie fueron DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972). para las primeras etapas de desarrollo del cultivo (TABLA I). A continuación se enlistan los componentes inorgánicos de ambos medios de cultivo para 1000 ml de medio.

TABLA I

Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD.

Nutrientes (mg l ⁻¹)	Medio DCR	Medio GD
NH ₄ NO ₃	400.00	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	200.00
KN ₃	340.00	1000.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00	250.00
KH ₂ PO ₄	170.00	-----
CaCl ₂ 2H ₂ O	85.00	150.00
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556.00	-----
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	-----	300.00
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-----	56.30
KI	0.83	0.75
KCl	-----	90.00
H ₃ BO ₃	6.20	3.00
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	10.00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60	3.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.0025	-----
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	27.80
Na ₂ EDTA	37.30	37.30

Los componentes inorgánicos anteriormente señalados constituyen los medios de cultivo básicos. Sin embargo es indispensable la adición de componentes orgánicos en los medios de cultivo como los enlistados en (TABLA II).

TABLA II

Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD.

Vitaminas mg l ⁻¹	DCR	GD
Tiamina HCl	1.0	1.0
Glicina	2.0	---
Piridoxina-HCl	5.0	0.1
Glutamina	50.0	---
Ácido Nicotínico	5.0	0.1
Inositol	200.0	10.0
Caseína hidrolizada	500.0	---
Ácido abscísico	10.0	10.0
Bencilaminopurina	0.3	0.3
Bencilaminopurina	0.5	0.5
Ácido indolbutírico	10.0	10.0
Ácido naftalenacético	0.01	0.01

Una vez adicionados ambos componentes, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH y HCL al 1N a 5.7 y aforado a 1000 ml el medio fue suplementado con 0.5% de agar-gel (5gl⁻¹) como agente gelificante; pasándose a fundir en horno microondas por 7 min. Los medios de cultivo se dosificaron en frascos de vidrio de alimento infantil, con 25 ml de medio por unidad experimental. Estos fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C de temperatura y 1 atmósfera de presión por 15 min.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.3 Condiciones controladas del cultivo *in vitro*.

En general es necesario disponer de una cámara de cultivo donde se pueda controlar la luz y temperatura principalmente.

Las unidades del experimento permanecieron 6 semanas en condiciones controlados de fotoperiodo de 6h-luz a 100 $\mu\text{mol.m}^2.\text{S}^{-1}$ y temperatura de 26 °C (Figura 6).



Figura 6. Unidades del experimento en condiciones controladas de *Pinus maximartinezii*.

5.4. Modelo estadístico.

El modelo estadístico utilizado para este experimento fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2^3 , donde el factor A son los explantes, el factor B son los medios de cultivo y factor C son las concentraciones a los reguladores de crecimiento, con 8 repeticiones por tratamiento, siendo un total de 8 tratamientos. El modelo fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial el cual se expresa como: $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$. Los resultados fueron analizados a través de análisis de varianza utilizando el programa estadístico SPSS.

5.5 Etapas de la organogénesis.

El proceso morfogénético de la organogénesis implica la formación de estructuras unipolares como raíces y tallos el cual en coníferas se lleva a cabo en diversas etapas con la adición de diferentes reguladores de crecimiento (Tang *et al.*, 2004 b). Por su parte, Bergmann (1992), reporta que el éxito en un sistema organogénico determinado no es garantía para asegurar una respuesta favorable en otra especie.

5.5.1 Etapa de establecimiento aséptico

Lo que se pretende obtener en esta etapa es establecer cultivos viables. El éxito de esta etapa está determinado por la edad de la planta donadora, por su estado fisiológico y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la desinfección de los explantes (Pierik, 1990).

El material utilizado como fuente inicial de explantes corresponde a embriones cigóticos y cotiledones obtenidos de semillas maduras ambos fueron previamente desinfectados asépticamente y sembrados en posición horizontal con la finalidad de que todos los explantes estuvieran en contacto con los medios de cultivo DCR y GD, adicionados con BAP a razón de 0.3 y 0.5mg^l⁻¹ además con 0.01mg^l⁻¹ de NAA (Figura 3). Posteriormente las unidades experimentales fueron selladas y colocadas en un cuarto de incubación, bajo condiciones controladas con un fotoperiodo de 16hr-luz a 100 $\mu\text{mol.m}^2.\text{S}^{-1}$ a una temperatura de 26 °C. Después de 10 días del establecimiento

aséptico se evaluó el porcentaje de supervivencia y el porcentaje de contaminación de los explantes *in vitro*.

5.5.2 Etapa de inducción de primordios de yemas.

La función de esta etapa es incrementar el número de propágulos en cultivo *in vitro* (Hartmann y Kester, 1999). Para esta etapa de desarrollo del experimento, los explantes fueron transferidos a medio nuevo. Posteriormente las unidades experimentales fueron selladas y colocadas nuevamente en incubación, bajo las mismas condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. Una vez transcurridas 6 semanas, los explantes fueron evaluados. Se procedió a efectuar observaciones morfológicas en los tratamientos. La variable evaluada fue el porcentaje de explantes viables, mediante una prueba estadística no paramétrica de X^2 .

A continuación se muestran los tratamientos a los que fueron sometidos los explantes para estudiar su respuesta *in vitro* (TABLA III).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA III

Tratamientos a los que se sometieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de *Pinus maximartinezii* para estudiar su respuesta *in vitro* en las diferentes etapas.

Factor A Explante	Factor B Medio de cultivo	Factor C Concentración de reguladores de crecimiento mg l ⁻¹	Número de tratamiento
Cotiledones	DCR	0.3	1
		0.5	2
	GD	0.3	3
		0.5	4
Embrión	DCR	0.3	5
		0.5	6
	GD	0.3	7
		0.5	8

Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2³; donde el factor A: Explantes; factor B: Medios de cultivo; factor C: Concentración de los reguladores de crecimiento.

5.5.3 Etapa de alargamiento de yemas

Una vez concluida la etapa de inducción de yemas es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Harry y Thorpe, 1994).

Con la finalidad de favorecer el alargamiento de yemas, en ésta etapa, los cotiledones y embriones fueron transferidos a los medios DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972), eliminando los reguladores de crecimiento y disminuyendo la sacarosa a la mitad de su concentración. Este procedimiento se repitió

cada 15 días. En estas condiciones, los explantes permanecieron por seis semanas en el cuarto de incubación en las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que la etapa anterior. La variable evaluada fue el número de yemas que presentaban al menos 2 primordios foliares bien desarrollados.

5.5.4 Etapa de formación de brotes.

La función de esta etapa es incrementar el número de primordios foliares *in vitro*. Los brotes son subcultivados sobre medios de cultivo que pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento para probar su habilidad de producir brotes. (Lambardi *et al.*, 1993).

Con la finalidad de evaluar el número de brotes así como la longitud de los mismos los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a los mismos medios de cultivo de

la etapa anterior pero ahora adicionados con 0.1% de carbón activado manteniéndose en el cuarto de incubación durante 8 semanas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otro lado, con la finalidad de evaluar el índice de capacidad de formación de brotes, para determinar la eficiencia de los tratamientos se evaluó el porcentaje y promedio de explantes que presentaron respuesta. Utilizando la siguiente fórmula:

$$CBF = \frac{(\text{No. Promedio de brotes por Explante}) (\% \text{ de explantes que formaron brotes})}{100}$$

según la metodología utilizada por Lambardi *et al.*, (1993). Los efectos principales de explantes, medios de cultivo y concentraciones se estudiaron con un análisis de varianza

utilizando las interacciones de primero y segundo orden como estimadores del error experimental.

5.5.5 Etapa de enraizamiento de brotes.

El enraizamiento de brotes en angiospermas ha mostrado ser relativamente simple, mientras que en las gimnospermas se ha presentado mayor problema (Thorpe, 2004).

5.5.5.1 Enraizamiento *in vitro*.

En esta etapa de la organogénesis se establecieron tres experimentos, para el primero, los brotes fueron disectados de los explantes y sometidos a un tratamiento por 16h en una solución conteniendo 1.0 mg l^{-1} de IBA y 0.5 mg l^{-1} de ANA a un pH 4.5. Los brotes tratados fueron colocados en tres medios de cultivo (DCR, GD, MS), al 50

% de su concentración original de sales minerales y sacarosa en estado líquido y sólido (TABLA IV).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las unidades experimentales se transfirieron al cuarto de incubación en condiciones controladas de fotoperiodo de 16h-luz a $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ con una temperatura de $26 \text{ }^\circ\text{C}$, por ocho semanas. La variable evaluada fue el número de brotes con raíz.

TABLA IV

Componentes inorgánicos de los medios DCR, GD, MS y SH.

Nutrientes (mg l ⁻¹)	Medio DCR	Medio GD	Medio MS	Medio SH
NH ₄ NO ₃	400.0	-----	1650.00	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	200.00	-----	-----
KN0 ₃	340.00	1000.00	1900.00	2500.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00	250.00	370.00	400.00
KH ₂ PO ₄	170.00	-----	170.00	-----
CaCl ₂ 2H ₂ O	85.00	150.00	440.00	200.00
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556.00	-----	-----	-----
NaH ₂ PO ₄ 7H ₂ O	-----	300.00	-----	-----
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	-----	56.30	-----	-----
KI	0.83	0.75	0.83	1.00
KCl	-----	90.00	-----	-----
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	6.20	5.00
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	10.00	-----	10.00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60	3.00	8.60	1.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.10
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	0.25	0.025	0.20
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25	0.025	0.10
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.0025	-----	-----	-----
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	27.80	27.80	15.00
NaEDTA	37.30	37.30	-----	-----
Na ₂ . EDTA	-----	-----	37.30	300.00
MnSO ₄ 4H ₂ O	-----	-----	22.00	20.00
Sacarosa	30000.00	20000.00	30000.00	30000.00
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

Para esta etapa fue establecido un segundo experimento donde se utilizaron tres medios de cultivo modificados (TABLA IV). Al 75, 50 y 25 % de su concentración original de sales minerales y disminuyendo la sacarosa al 50%. Los brotes fueron sometidos asépticamente a un proceso de pulso el cual consistió en colocarlos en cada medio de cultivo (en estado líquido) adicionado con 10 mg l⁻¹ de IBA por un lapso de 72 h. Posteriormente se transfirieron por ocho semanas a los mismos medios de cultivo solidificados. La variable evaluada fue el número de brotes que presentaron raíces. El

diseño fue un completamente al azar con arreglo factorial 3^3 con 8 repeticiones por tratamiento.

Un tercer experimento consistió en utilizar brotes mayores de 1.0 cm de altura que fueron colocados en un tratamiento de pulso de 1.0 mM de IBA a diferentes tiempos de exposición: 6, 12 y 24 h; posteriormente fueron colocados en los medios (DCR y GD) al 100% y al 50% de concentración de las sales minerales, sin reguladores de crecimiento, con la mitad de la concentración de la sacarosa y 1.0 y 0.5 % de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por ocho semanas en el cuarto de incubación. Los tratamientos fueron establecidos al azar, regidos por un factorial 2^3 , con 8 repeticiones por tratamiento, donde la variable evaluada fue número de plantas con raíz y número de raíces por planta.

5.5.5.2 Enraizamiento de brotes *in vivo*.

La técnica *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente ya que ocasionalmente se forma callo en la base de las plantas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Diversos estudios han demostrado el potencial de usar hongos micorrízicos para la propagación vegetativa. Además la inoculación puede incrementar la habilidad de las plántulas para contrarrestar el estrés producido por la transferencia *ex vitro*. De modo que ciertos factores puedan actuar de manera sinérgica lo que puede llevar a respuestas positivas en los genotipos que sean compatibles con los hongos (Niem. *et al.*, 2004).

En ésta etapa fueron utilizados brotes de 3.0 cm de altura, los cuales se sometieron a un tratamiento con Benlate a razón de 150 mg l⁻¹ por 30 minutos. (Figura 7 a, b). Posteriormente se colocaron por separado en un sustrato 1:1:1 de peat moss, perlita y arena de río (Figura 7c). Cada brote fue regado con una solución esterilizada al 0.2 gl⁻¹ de Raizal^{MR} y cubierto con bolsa de plástico (Figura 7d).

Se establecieron 30 unidades experimentales en condiciones controladas de luz y temperatura, evaluándose el número de plantas con raíces después de 4 semanas.

Se estableció un segundo experimento, inoculando con esporas de micorrizas (*Ectomycorrhiza*) a razón de 1.0 mg l⁻¹ adicionado con una gota de jabón líquido por cada 150 ml de agua.

Las unidades fueron establecidas en las mismas condiciones que el experimento anterior; estableciéndose 30 unidades experimentales. La variable evaluada a las 4 semanas fue el número de brotes que presentaron raíz.

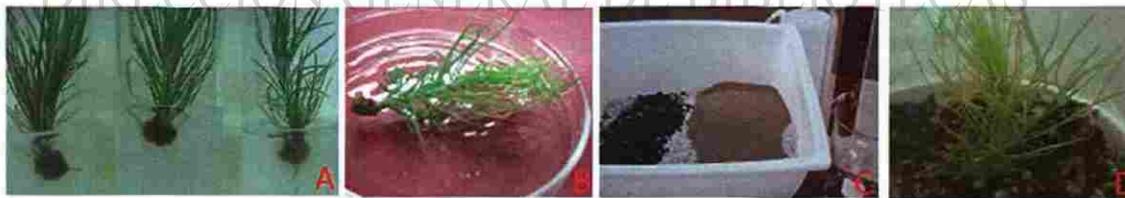


Figura 7. Brotes enraizados *in vivo* de *Pinus maximartinezii*. A, Brotes mayores de 3 cm de altura; B, Brote con la base lavada; C, Sustrato en proporción de 1:1:1; D, Brote cubierto con plástico.

5.5.6 Aclimatación de las plantas.

Para favorecer la aclimatación de las plantas es necesario llevar a cabo el proceso gradualmente, puesto que la inestabilidad de las plantas transplantadas es debido en parte, a la falta de raíces primarias; así como a la incidencia de malformaciones en el sistema radicular. (Selby y Seaby, 1982).

Con el propósito de lograr la aclimatación, las plantas enraizadas fueron transferidas a macetas que contenían sustrato de peat moss, perlita y arena de río en proporción de 1:1:1 (Figura 8 a, b). Las unidades experimentales se regaron con agua bidestilada. Todas las macetas fueron cubiertas por 4 semanas con bolsas de plástico transparente para mantener la humedad relativa alta. (Figura 8c).

Posteriormente las macetas permanecieron en condiciones de invernadero por dos semanas; gradualmente, las bolsas plásticas fueron perforadas hasta que se eliminaron por completo. Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de supervivencia y número de plantas aclimatadas (Figura 8d).



Figura 8. Plantas aclimatadas de *Pinus maximartinezii* después de 8 semanas del establecimiento en esta etapa. A, Planta con raíz; B, Planta establecida *in vivo*; C, Plantas a las 4 semanas; D, Planta a las 8 semanas.

6. RESULTADOS

6.1 Variables evaluadas en las etapas de organogénesis.

Los resultados de las variables en estudio, fueron transformados calculando la raíz cuadrada para ser utilizados en los análisis de varianza y asegurar una distribución normal (Snedecor y Cochran, 1971).

6.1.1 Establecimiento aséptico de los explantes.

A los 10 días del establecimiento *in vitro*, se determinó un 0 % de contaminación y 100% de supervivencia para todos los tratamientos del experimento en ambos explantes (Figura 9).

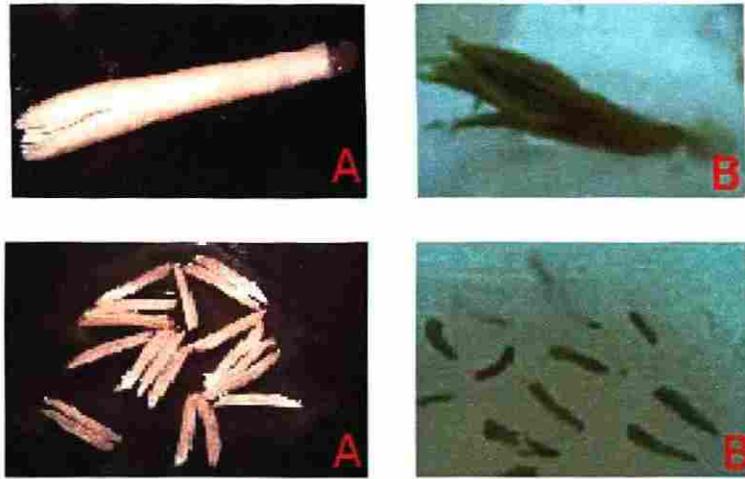


Figura 9. Respuesta observada en el establecimiento *in vitro* de *Pinus maximartinezii*. A, Establecimiento aséptico de los explantes; B, Respuesta de los explantes a los 10 días.

6.1.2 Inducción de primordios de yemas

Los embriones cigóticos y cotiledones utilizados en esta etapa presentaron cambios morfológicos que se hicieron evidentes desde los primeros 5 días de iniciado el cultivo. Ambos explantes evidenciaron cambios en la tonalidad de un color crema inicial a un verde claro; posteriormente la tonalidad verde se volvió más intensa y con pigmentos púrpura, iniciándose el proceso de dediferenciación.

A las 6 semanas de iniciado el cultivo, en ambos explantes se observó la formación de estructuras nodulares similares a callos con primordios de yemas presentes. El análisis de varianza para esta etapa no detectó diferencias significativas entre los tres factores estudiados. Se puede observar la respuesta obtenida en la Figura 10 donde se muestran cambios cualitativos en la morfología de los explantes. La prueba no

paramétrica no presentó diferencia significativa para tratamientos, puesto que el 100% de los explantes mostraron respuesta.

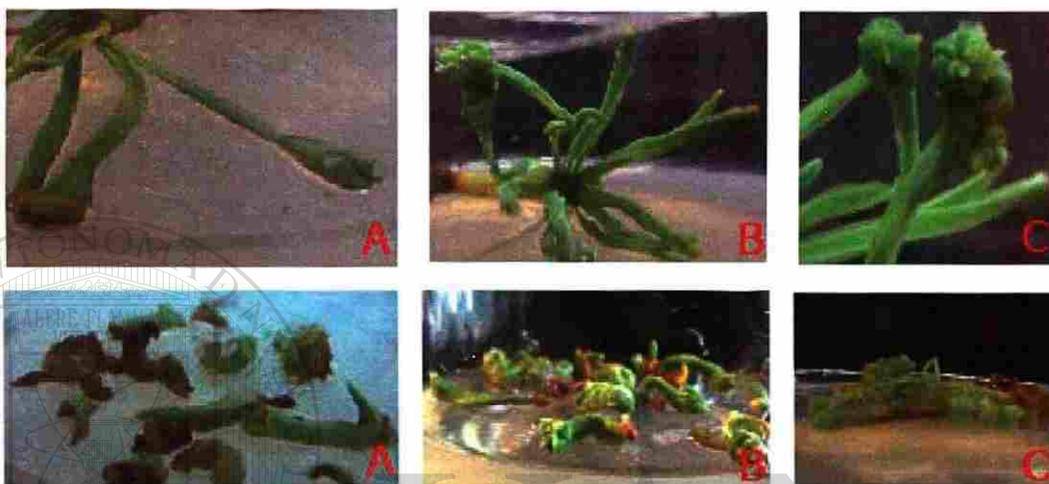


Figura 10. Formación de estructuras nodulares en embriones cigóticos y cotiledones de *Pinus maximartinezii* a las 6 semanas después de la transferencia *in vitro*. A, Desdiferenciación de los explantes *in vitro*; B, Respuesta a las 3 semanas del establecimiento *in vitro*; C, Respuesta a las 6 semanas del establecimiento *in vitro*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

6.1.3 Alargamiento de yemas

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El análisis de varianza no presentó diferencias significativas para ningún factor en esta variable. La comparación de medias a las seis semanas del cultivo se muestra en la (TABLA V).

160698

TABLA V

Número de yemas promedio de *Pinus maximartinezii* que presentaban 2 primordios foliares a las seis semanas en la etapa de alargamiento.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
1.093a	1.375a	1.312a	1.156a	1.281a	1.187a

Literales diferentes dentro de cada factor indican diferencias significativas entre los niveles ($P=0.05$).

Sin embargo, la Figura 11 muestra la respuesta obtenida en ambos explantes.

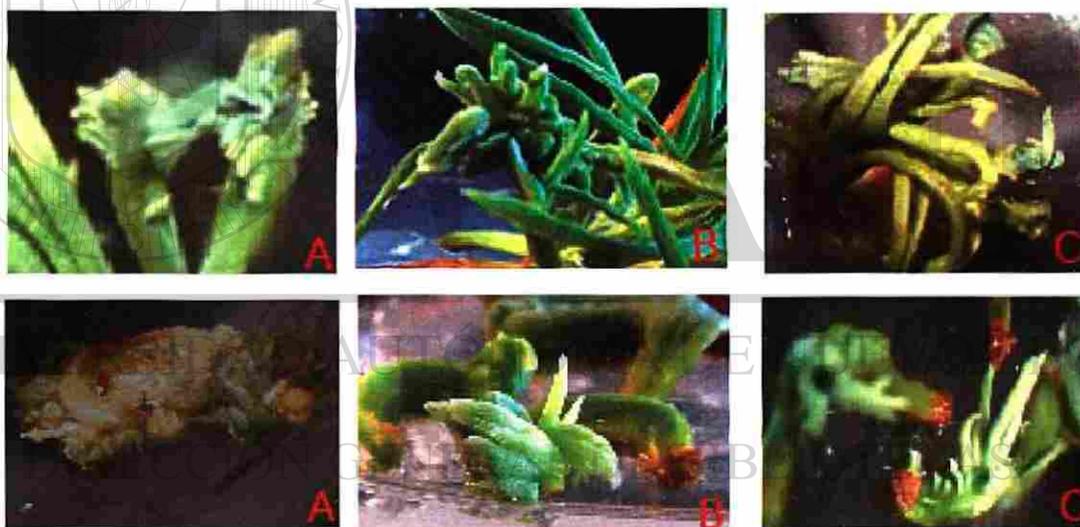


Figura 11. Alargamiento de yemas en embriones cigóticos y cotiledones de *Pinus maximartinezii* a las 2, 4 y 6 semanas de la transferencia en los medios de cultivo. A, Explantes con yemas a las 2 semanas de la transferencia; B, Yemas a las 4 semanas de la transferencia; C, Elongación de yemas a las 6 semanas de la transferencia.

6.1.4 Formación de brotes

Con respecto a la variable número de brotes, el análisis de varianza mostró diferencia significativa para medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento (TABLA VI).

TABLA VI

Análisis de varianza para la variable número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante (E)	0.563	1	0.563	0.174	0.678
Medio (M)	22.563	1	22.563	6.981	0.011 *
Concentración (C)	14.063	1	14.063	4.351	0.042*
E x M	1.000	1	1.000	0.309	0.580
E x C	0.250	1	0.250	0.077	0.782
M x C	0.250	1	0.250	0.077	0.782
E x M x C	6.250E-02	1	6.250E-02	0.019	0.890
Error	181.000	56	3.232		
Total	219.750	63			

*Diferencia significativa

Así mismo, la comparación de medias mostró diferencia estadística para medios de cultivo presentando un mayor número de brotes en el medio DCR (4.031), comparado con el GD donde se encontraron (2.844) en promedio (Figura 12).

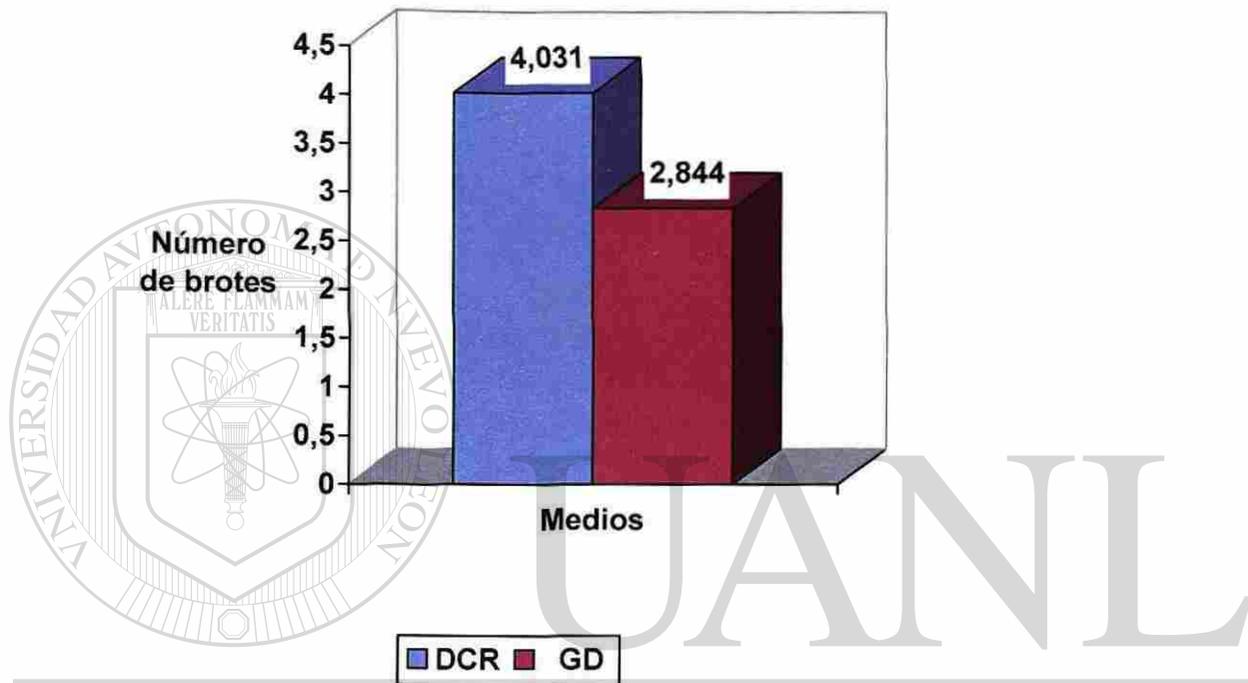


Figura 12. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro* en los medios DCR Y GD.

La comparación de medias para concentraciones de reguladores de crecimiento, mostró diferencia significativa ($p=0.042$); presentando un mayor número de brotes con 0.5 mg l^{-1} de BAP (3.906), comparado con la concentración de 0.3 mg l^{-1} donde se obtuvieron 2.969 en promedio (Figura 13).

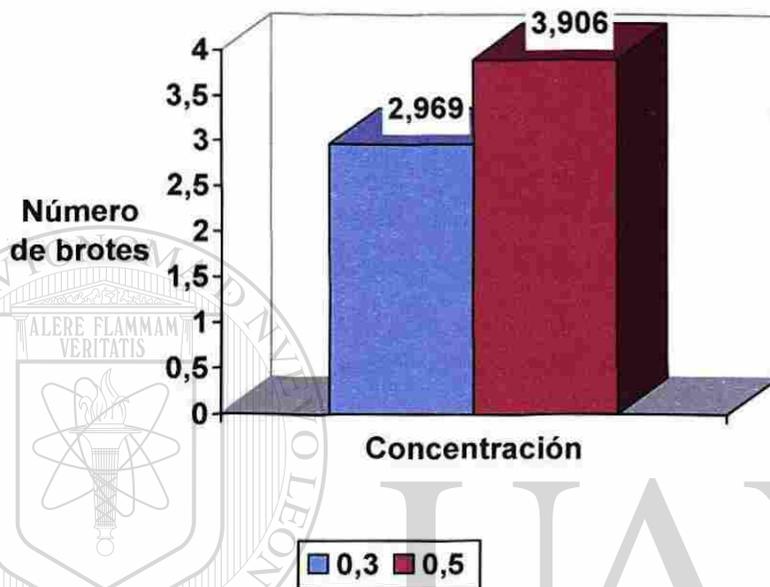


Figura 13. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro* en dos concentraciones de BAP.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.1.5 Longitud de brotes

Otra de las respuestas de interés en el cultivo *in vitro*, que se asocia con el crecimiento y desarrollo del explante, es la longitud de brotes. El análisis de varianza de esta variable se muestra en la (TABLA VII).

TABLA VII

Análisis de varianza para la variable longitud de brotes obtenidos a las 8 semanas en la triple interacción en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante (E)	0.281	1	0.281	1.459	0.239
Medio (M)	1.531	1	1.531	7.946	0.010
Concentración (C)	2.000	1	2.000	10.378	0.004
E x M	0.125	1	0.125	0.649	0.429
E x C	2.531	1	2.531	13.135	0.001
M x C	0.781	1	0.781	4.054	0.055
E x M x C	8.000	1	8.000	41.514	0.000
Error	4.625	24	0.193		
Total	19.875	31			

El análisis de varianza mostró diferencia significativa en la triple interacción por lo que se procedió a realizar la comparación de medias en cotiledones y embriones (TABLA VIII).

TABLA VIII

Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable longitud de brotes de *Pinus maximartinezii*.

Explante	Medio	Concentración	Longitud de brote en cm.
Cotiledones	DCR	0.3	2.25 a
Cotiledones	DCR	0.5	1.0 b
Cotiledones	GD	0.3	1.25 b
Cotiledones	GD	0.5	2.625a
Embrión	DCR	0.3	1.5 b
Embrión	DCR	0.5	1.125b
Embrión	GD	0.3	2.75 a
Embrión	GD	0.5	1.0 b

Cuando se utilizaron los cotiledones como explante, se presentó mayor longitud con el medio DCR a concentración de 0.3 mg^l⁻¹ y para el medio GD se presentó con 0.5

mg l⁻¹. Al utilizar el embrión como explante, la mayor longitud se observó en el medio GD con 0.3 mg l⁻¹.

6.1.6 Capacidad de formación de brotes

Con la finalidad de tener mediciones cuantitativas objetivas que puedan ser utilizadas para seleccionar los mejores tratamientos, se evaluó el índice de capacidad de formación de brotes. El análisis de varianza se muestra en la (TABLA IX).

TABLA IX

Análisis de varianza de la variable capacidad de formación de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante	20.225	1	20.225	249.381	0.000 *
Medio	0.442	1	0.442	5.448	0.080
Concentración	0.336	1	0.336	4.145	0.111
Error	0.324	4	8.110E-02		
Total	21.327	7			

* Diferencia significativa

La comparación de medias para el factor explante muestra que el embrión fue superior a los cotiledones. En cuanto al medio de cultivo, el DCR presentó mayor respuesta que el GD (TABLA X).

TABLA X

Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable capacidad de formación de brotes de *Pinus maximartinezii*.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
0.520a	3.700b	2.345a	1.875b*	1.905a	2.315a

Literales diferentes dentro de cada factor indican diferencias significativas entre los niveles ($P=0.05$). * Significativa al 0.08 de probabilidad.

En la Figura 14, se muestra el proceso de formación de brotes en ambos explantes; se consideraron solo aquellos que mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados.



Figura 14. Proceso de formación de brotes de *Pinus maximartinezii* a las 8 semanas de cultivo. A, Explantes con primordios foliares; B, Formación de brotes en desarrollo; C, Brotes diferenciados a partir de embrión cigótico; D, Brotes diferenciados a partir de cotiledones.

6.1.7 Enraizamiento de brotes

En los brotes establecidos en los tratamientos del primer experimento, después de 8 semanas de cultivo *in vitro*, no fue posible analizar los datos estadísticamente puesto que los explantes que se mantuvieron tanto en medio líquido como sólido, se oxidaron hasta llegar a la senescencia total del brote (Figura 15a).



Figura 15. Respuesta de los brotes de *Pinus maximartinezii* a las 8 semanas en medios de cultivo para promover enraizamiento *in vitro*. A, Respuesta de los explantes en medio sólido; B, Respuesta de los explantes en medio líquido.

En el segundo experimento los brotes establecidos tendieron a formar callo en la base pero continuaron su crecimiento y no existió oxidación ni senescencia, estos brotes fueron utilizados para tratamientos, posteriores de enraizamiento *in vivo* (Figura 16).



Figura 16. Brotes de *Pinus maximartinezii*.

Con respecto al tercer experimento, los resultados fueron evaluados y se compararon los medios en cuanto a la formación de raíz; se realizó un análisis de Ji-cuadrada con la información de la TABLA XI, en donde se observa que la mayoría de los brotes no formaron raíces. La prueba de Ji-Cuadrada mostró que no hubo diferencia significativa entre los medios en cuanto al número de raíces formadas (TABLA XII).

TABLA XI

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces en los medios DCR y GD.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
MEDIO	DCR	38	8	2	48
	GD	41	6	1	48
Total		79	14	3	96

TABLA XII

Prueba de Ji-Cuadrada para la comparación de medios de cultivo en cuanto al número de raíces formadas en *pinus maximartinezii*.

	Valor	Gl	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	0.733	2	0.693

Por otro lado, se determinó que la concentración de los medios de cultivo no contribuyó en mejorar el enraizamiento. La concentración con el 100% de las sales minerales presentó un total de 5 brotes con una raíz y un brote con dos raíces, mientras que la concentración con la mitad de las sales minerales presentó 9 brotes con formación de una raíz y dos con dos raíces (TABLA XIII). La prueba de Ji-cuadrada mostró que no hubo diferencia significativa ($p=0.408$) entre las 2 concentraciones en cuanto al número de brotes que formaron raíz (TABLA XIV).

TABLA XIII

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces con diferentes concentraciones de sales minerales.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
Concentración	100%	42	5	1	48
	50%	37	9	2	48
Total		79	14	3	96

TABLA XIV

Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de concentración de medios en cuanto al número de raíces formadas en *Pinus maximartinezii*.

	Valor	Gf	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	1.793	2	0.408

En el experimento correspondiente a los tiempos de pulso, únicamente 3 brotes formaron una raíz en los tiempos de 6h y 12h; sin embargo, el tratamiento de 24h presentó 8 brotes con una raíz y 3 con dos raíces (TABLA XV). Encontrándose diferencias significativas en la prueba de Ji. Cuadrada con ($p= 0.024$) entre los tres tiempos de pulso en cuanto al numero de brotes con formación de raíces (TABLA XVI). Esto indica que el tiempo de pulso puede ser un factor importante en la diferenciación de raíces.

TABLA XV

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces expuestos a tres tiempos de pulso.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
TIEMPO	6 h	29	3	0	32
	12 h	29	3	0	32
	24 h	21	8	3	32
Total		79	14	3	96

TABLA XVI

Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de tres tiempos de pulso en cuanto al número de raíces formadas en *Pinus maximartinezii*.

	Valor	Gl	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	11.192	4	0.024

En la Figura 17 se muestra la mejor respuesta en cuanto a los tiempos de pulso a los que fueron sometidos los brotes.

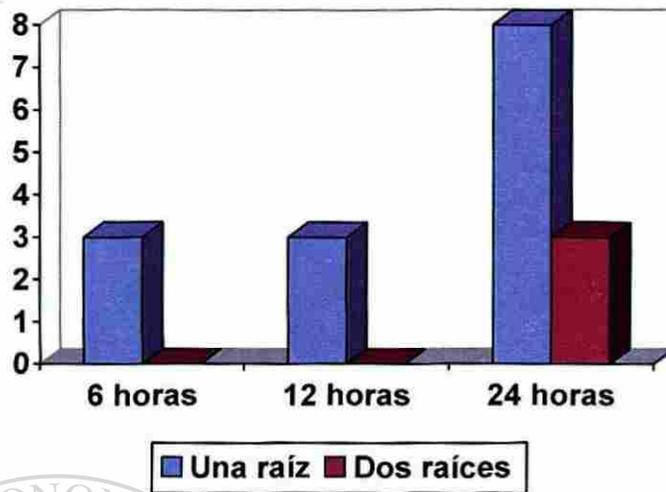


Figura 17. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que formaron raíces en tres tiempos de exposición al pulso.

A las ocho semanas se midió longitud y el número de raíces en las unidades experimentales en donde se manifestó formación de raíz. Con esta información se obtuvo el crecimiento promedio de raíces a las ocho semanas. Esta variable se utilizó para comparar los niveles de los factores estudiados (medios, concentraciones y

tiempos) utilizando un análisis de varianza, con la finalidad de evaluar el efecto de estos factores sobre el crecimiento de raíces.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En cuanto a la comparación de los medios de cultivo, se encontró que no hubo diferencias significativas entre éstos para el crecimiento promedio de raíces (TABLAS XVII y XVIII).

TABLA XVII

Análisis de varianza para la comparación de medios de cultivo utilizados para crecimiento de raíz *in vitro* en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Medio	3.661	1	3.661	0.820	0.379
Error	66.957	15	4.464		
Total	70.618	16			

TABLA XVIII

Medias de crecimiento de raíz (mm) de *Pinus maximartinezii* obtenidas en dos medios de cultivo a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

Medio	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
DCR	7.700	0.668	6.276	9.124
GD	8.643	0.799	6.941	10.345

De igual manera las concentraciones de los medios de cultivo no tuvieron influencia en el crecimiento de raíz, como se observa en (TABLAS XIX y XX).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA XIX

Análisis de varianza para la comparación de concentraciones de medios de cultivo en cuanto al crecimiento de raíz de *Pinus maximartinezii in vitro*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Concentraciones	1.061	1	1.061	0.229	0.639
Error	69.55	15	4.637		
Total	70.61	16			

TABLA XX

Medias de crecimiento de raíz (mm) de *Pinus maximartinezii* obtenidas en dos concentraciones de medios de cultivo a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

Concentración	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
100%	7.750	0.879	5.876	9.624
50%	8.273	0.649	6.889	9.657

Los tiempos al pulso no mostraron diferencias significativas para el crecimiento de raíz (TABLAS XX I y XXII).

TABLA XXI

Análisis de varianza para la comparación de tiempos al pulso en cuanto al crecimiento de raíz en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tiempo	7.375	2	3.688	0.816	0.462
Error	63.242	14	4.517		
Total	70.618	16			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Medias de crecimiento de raíz (mm) en tres tiempos de exposición al pulso en *Pinus maximartinezii*.

Tiempo	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
6 horas	8.333	1.227	5.701	10.965
12 horas	6.667	1.227	4.035	9.299
24 horas	8.409	0.641	7.035	9.784

La Figura 18 muestra brotes que formaron raíces después de ocho semanas de permanecer en condiciones de cultivo *in vitro*.

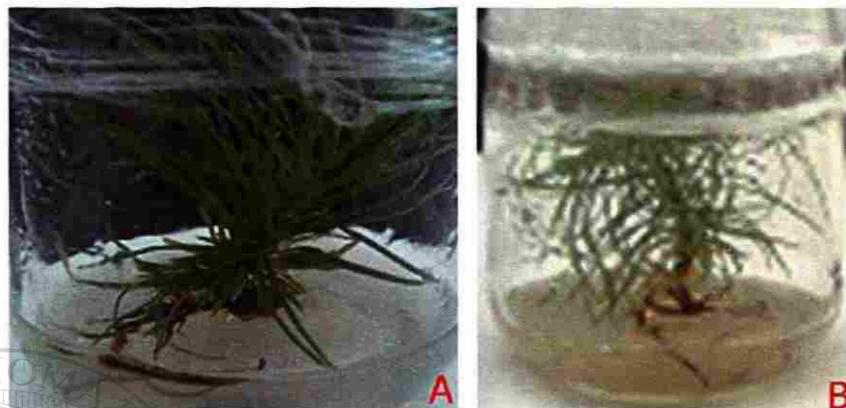


Figura 18. Brotes con raíces después de 8 semanas en los medios de enraizamiento en *Pinus maximartinezii*. A, Brotes con raíz en el medio DCR; B, Brotes con raíz en el medio GD.

6.1.7.1 Enraizamiento de brotes *in vivo*.

Después de 4 semanas en el sustrato 1:1:1 de peat moss, perlita y arena de río, los brotes presentaron 13.33 % de enraizamiento; 20.01 % no formaron raíces; afectando también el que 66.66 % de los brotes presentaran problemas de marchitamiento (damping-off).

Por otro lado, en los resultados del experimento donde adicionalmente se inocularon esporas micorrízicas; 23.33 % de los brotes formaron raíces; 43.34 % no diferenciaron raíz y 33.33 % presentaron damping-off.

6.1.8 Aclimatación de plantas

Con los sustratos utilizados se logró obtener el 50% de plantas aclimatadas. En el porcentaje restante se presentaron problemas de marchitamiento. La figura 19 muestra la secuencia del proceso de aclimatación.



Figura 19. Plántulas de *Pinus maximartinezii* aclimatadas después de 8 semanas en condiciones controladas y de invernadero. A, Plántula para la aclimatación; B, Plántula con raíz lavada; C, Plántula con humedad relativa controlada; D, Plántulas aclimatadas a las 8 semanas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



2. HIPÓTESIS

De acuerdo al medio de cultivo *Pinus maximartinezii* presenta diferente potencial de regeneración *in vitro*.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la micropropagación de *Pinus maximartinezii* que permita su preservación *in vitro*

3.2 Objetivos particulares

Determinar el medio de cultivo más apropiado, para cada una de las etapas de la micropropagación.

Definir la dosis óptima del regulador de crecimiento que promueve la máxima multiplicación de brotes *in vitro*.

4 ANTECEDENTES

4.1 Importancia económica de las pináceas

Los bosques son muy importantes en la economía mundial para el mantenimiento y preservación de nuevos ecosistemas (Altman, 2003). La productividad de las plantaciones forestales es esencial para satisfacer las demandas de productos maderables y así preservar las poblaciones naturales y la biodiversidad (Nehra, 2005).

Generalmente, las pináceas constituyen la principal fuente de materia prima en productos maderables; los cuales desempeñan una fuente importante de empleo en las comunidades rurales y urbanas. Sin embargo, los usos domésticos presentan un factor destructivo, ya que son utilizados como combustible, cercos, vigas, etc. Por otra parte, las semillas son utilizadas como alimento para el hombre y la fauna silvestre (Escoto, 1988).

Para disminuir el incremento en la demanda de los bosques ya existentes, es necesario un esfuerzo global para incluir las especies forestales en la era moderna del fitomejoramiento; por lo que, los programas de mejoramiento de árboles deben combinar las técnicas más sofisticadas de biología molecular y las tradicionales. junto con una eficiente propagación clonal a gran escala, constituyen elementos clave para el

manejo y reforestación exitosa de bosques comerciales (Altman, 2003). Por lo anterior es importante desarrollar programas relacionados con la conservación de este recurso natural.

4.2 Características de las pináceas.

Son árboles o arbustos de tallo leñoso monopódico y ramificado, con hojas pequeñas alternas, opuestas o verticiladas, comúnmente aciculares o escuamiformes y aveceoladas. Las flores femeninas y masculinas forman por lo regular zonas aisladas o en grupos. Sus frutos son por lo común conos con escamas lignificadas o carnosas. Las semillas tienen alas, pero muchas pináceas carecen de ellas. La raíz carece de pelos absorbentes; en sustitución de los mismos se desarrollan hongos que las envuelven y forman micorrizas, las cuales desempeñan el papel de los pelos radicales. Su corteza está más o menos suberificada, en la mayoría de ellas existen canales resiníferos. Por lo general, son plantas perennes, están renovando constantemente sus hojas (Rzedowski, 1978).

4.3 Distribución geográfica.

Las pináceas tienen en la flora mexicana enorme importancia desde el punto de vista forestal. Una gran mayoría se localiza en lugares montañosos, templados y fríos, solamente pocas especies se desarrollan en lugares subtropicales. La familia de las pináceas comprende en México 8 géneros:

1. *Pinus*, con 38 especies, 10 variables y 16 formas
2. *Picea*, con 2 especies
3. *Pseudotsuga*, con 4 especies y una variable
4. *Abies*, con 8 especies y 5 variables
5. *Taxodium*, con una especie
6. *Libocedrus*, con una especie
7. *Cupressus*, con 6 especies y 2 formas
8. *Juniperus*, con 12 especies, 6 variables y 3 formas

El género *Pinus* es el de más amplia distribución (Martínez, 1963). Habita principalmente en zonas templadas y frías aunque también se encuentra en las altas mesetas y montañas de algunas zonas tropicales: se puede desarrollar desde el nivel del mar hasta 4000 m de altura (Rzedowski, 1978).

4.4 Clasificación botánica de la especie.

Reino: Vegetal

División: Embryophyta Siphonogama

Subdivisión: Gymnospermae

Orden: Coniferae

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Especie: *maximartinezii*

(Lawrence, 1971).

4.5 Historia y origen del *Pinus maximartinezii* (Rzedowski).

Hace 42 años se dió a conocer como una especie nueva (Rzedowski, 1964), después de que fue identificada a raíz de que su semilla se comercializaba como un producto local en el mercado de Juchipila. Zacatecas.

Hoy en día se tienen 5 reportes sobre la variación genética (Delgado, 2002; SEMARNAT, 2003). También sobre acciones de conservación, mejora genética, obtención de semillas, ubicación de especies amenazadas (Vargas, 2003) y sobre la composición natural de las semillas (Mata 2001a). Es una especie que está considerada como endémica y ha sobrevivido a una restricción genética extrema (Ledig *et al.*, 1999). Catalogada en peligro de extinción por la legislación ambiental mexicana (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002).

4.6 Descripción botánica de la especie.

Pinus maximartinezii, son árboles de 5 a 10 m de altura y de 15 a 25 cm de diámetro. No obstante se puede encontrar hasta de 20 m de altura y 60 cm de diámetro. Esta especie presenta ramificaciones múltiples, es raro que se presente dominancia monoatómica en alguna parte apical. Los tallos cuando son arbustos son lisos de color grisáceo, cambiando luego con el tiempo a grisáceo-cafesoso. Las ramas son largas, delgadas y flexibles de color verde grisáceo. Las hojas se disponen en fascículos de cinco, son delgadas y flexibles de 8 a 10 cm de largo y de 0.3 a 0.6 mm de ancho, distribuidas al final de las ramas, presentan estomas en la parte ventral, la parte dorsal

presenta un color verde brillante de 6 a 8 mm dispuestas en rosetas. El color es cambiante, varía dependiendo de la época del año; presenta desde el color grisáceo y el color azulado en diferentes tonalidades. Los conos son simétricos, miden en promedio de 18 a 22 cm de largo y de 10 a 15 cm de ancho cuando están abiertos. Un cono verde llega a medir hasta 35 cm de largo y pesar hasta 2 kg. Las semillas miden de 20 a 25 mm de largo y 10 a 12 mm de ancho, son oblongas y color café brillante; el embrión se encuentra encerrado por el gametofito y la testa la cual es dura y tiene un espesor de 1.5 mm (Ling y Leung, 2003). El endospermo es de color blanco con 18 a 24 cotiledones y son comestibles (Martínez, 1963).

4.7 Importancia económica de la especie en estudio.

El Piñón azul o maxi Piñón *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002) en peligro de extinción que ha sobrevivido a una restricción genética extrema y se considera el más raro de los pinos piñoneros ya que está confinada a una sola población de aprox. 2000 a 2500 árboles maduros (Ledig, 1999), su distribución se limita dentro de un área que apenas rebasa las 2.800 ha y al parecer nunca se ha extendido más de sus límites actuales (López, 1998), se localiza entre 1,110 a 2,500 msnm. Su ubicación geográfica se encuentra en los paralelos 21°19' y 21°23' de latitud norte y entre los meridianos 103°12' y 103°14' de longitud oeste; por sus características biogeográficas a este polígono llamado Cerro Piñones de 2.800 ha se le denomina ecosistema del *Pinus maximartinezii*. Rzed; está en el extremo sur de Sierra Morones en el Estado de Zacatecas México (Ruiz *et al.*, 2006).

La regeneración de la especie es muy escasa o prácticamente inexistente, debido a que las semillas son utilizadas como alimento y la cosecha se realiza cortando las ramas con machete y esto reduce el número de yemas para futuros brotes por lo tanto, se disminuye su reproducción natural (Ledig, 1999). Así mismo, los incendios forestales y el sobre pastoreo, fueron los factores que en cierta medida contribuyeron a disminuir el tamaño de la población del bosque. Esta especie tiene potencial para ser utilizada como planta de ornato, como árbol de navidad, para reforestación de áreas urbanas y recreativas, los conos tienen mucha aceptación en la industria del regalo y decoración en temporadas navideñas (Quintero, 1996).

4.8 Importancia mundial de la diversidad genética.

El mantenimiento de la diversidad genética se ha convertido en un problema de importancia mundial debido a la deforestación, contaminación y los cambios climáticos.

Es por esto, que la mayoría de los mejoradores, hacen énfasis en la importancia del mantenimiento de la variabilidad genética, ya que una disminución en la diversidad o la pérdida de una especie podrían dañar severamente el ecosistema y reduciría las posibilidades de tener una fuente natural para el mejoramiento futuro de otras especies. El incremento en la demanda por productos maderables y la reducción de bosques disponibles ha llevado recientemente a la introducción de varias herramientas moleculares y biotecnológicas para investigar y mejorar este recurso (Grout, 1995; Altman, 2003).

Aunque la conservación del hábitat será siempre lo más crítico en el mantenimiento del máximo nivel de diversidad vegetal, las técnicas *in vitro* pueden proveer métodos alternativos para propagar y conservar tejidos de plantas amenazadas o en peligro de extinción (Pence, 1991; Fay, 1994; Charls y Pence, 2004). A esta categoría pertenece *Pinus maximartinezii* que está catalogada como una especie endémica y en peligro de extinción debido al tamaño restringido de su población (Ledig, 1999), por lo que la micropropagación y la caracterización molecular se han convertido en una herramienta muy importante para la supervivencia de las especies amenazadas con la extinción y constituyen una alternativa para la preservación de las mismas (Maruyama *et al.*, 2006). Sin embargo las técnicas deben ser adaptadas en cada una de las especies que permanecen todavía sin ser estudiadas (Hargreaves *et al.*, 2005).

La identificación de los recursos genéticos es solamente una parte del trabajo, una vez que se han identificado, los recursos deben ser conservados y aunque el almacenamiento de semillas es el método más común para la mayoría de las especies, es un hecho que no todas las especies pueden ser almacenadas como semilla ya que algunas permanecen viables solamente unas pocas semanas a un año. Las semillas de coníferas pueden ser almacenadas por décadas pero eventualmente este material necesita ser renovado a partir de nuevos árboles. Este proceso de producir semilla nueva es caro y durante la selección puede modificarse el recurso genético (Ledig, 1988; Grout, 1995). Por lo tanto, el desarrollar un protocolo para el entendimiento de cómo se lleva a cabo un crecimiento organizado en las plantas, es muy importante para utilizar la biotecnología en aplicaciones prácticas (Thorpe, 2004).

4.9 Impacto de biotecnología vegetal.

La biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que más desarrollo ha demostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. La biotecnología es una práctica que junto con el mejoramiento tradicional utiliza los descubrimientos básicos en el campo de cultivo de tejidos vegetales para la clonación, transferencia de genes, biología molecular y genómica (Altman, 2003; Nehra *et al.*, 2005). Estas disciplinas son sin duda una herramienta invaluable para incrementar tanto la cantidad como la calidad de los alimentos de origen vegetal.

4.10 Propagación de las pináceas.

Tradicionalmente las Pináceas son propagadas a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. El largo período de crecimiento desde semilla a floración varía de 15 a 20 años, provocando grandes obstáculos para el mejoramiento tradicional (Go *et al.*, 1993). Así mismo, la propagación vegetativa presenta una serie de problemas ya que la capacidad de enraizamiento es baja. Ante este panorama, la técnica de cultivo de tejidos vegetales representa una posible solución para los problemas forestales. En los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas que pueden llegar a sustituir los métodos de propagación vegetativa tradicional (Lambardi *et al.*, 1993). Mediante ésta técnica, se ha logrado propagar más de 50 especies del género *Pinus*.

utilizando embriones cigóticos como fuente de inóculo (Thorpe, 1990). Los inóculos (explantes) son multiplicados *in vitro* rápidamente y esto resulta en la producción de plantas que muchas veces alcanzan varios miles después de un año (Hargreaves *et al.*, 2002). Por lo tanto, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta muy importante en los programas de especies amenazadas con la extinción (Mata *et al.*, 2001b) debido a la versatilidad de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* (Capuana, 2001).

4.11 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales en coníferas.

Desde finales de los setentas se han hecho evidentes las contribuciones por parte de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales en la agricultura y la industria (Murashige, 1978; Pierik, 1990b). Salvaguardar los recursos genéticos continúa siendo una de las aplicaciones más importantes (Capuana, 2001), ya que puede ser muy útil para la rápida propagación clonal de genotipos superiores en un periodo más corto (Chesik, 1991). Se reporta que, el mejoramiento genético en coníferas es por lo general difícil debido a los largos periodos previos a la floración. Además la polinización es cruzada, lo que dificulta la selección de árboles con características superiores (Saborío, 1996; Saborío *et al.*, 1997).

La primera gimnosperma regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Pinus palustris* a partir de embriones (Sommer *et al.*, 1975). Con posterioridad a estas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de 57 especies maderables por sistemas similares; donde se ha logrado la formación de

plantas completas *in vitro* (Mott, 1981; Thorpe *et al.*, 1990; Prehn *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006).

4.12 Micropropagación en coníferas.

El uso más extensivo del cultivo de tejidos vegetales ha sido la micropropagación: el cual es un término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*; el cual consiste en propagar un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. Esta es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniformes a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Pierik, 1990 a).

La micropropagación es una alternativa que ha sido usada eficientemente en la propagación de coníferas. Esta técnica permite acelerar la selección, el mejoramiento y los periodos de prueba de las especies prometedoras; favoreciendo así la multiplicación de genotipos superiores identificados en campo (Anderson e Ievinsh, 2002 a y b). Es también un método complementario para los bancos de germoplasma; las modernas técnicas de ADN recombinante, en combinación con la micropropagación podrían crear una rápida modificación del genoma de las coníferas (Saborio, 1996). lo que llevaría a acelerar el proceso de domesticación a través de la selección y propagación de árboles élite en programas de mejoramiento (Nehra *et al.*, 2005). La versatilidad de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* de especies forestales incluyen:

multiplicación de brotes axilares, organogénesis y embriogénesis somática (Capuana, 2001; Altman, 2003).

Los sistemas de propagación *in vitro* más utilizados en coníferas son la organogénesis y la embriogénesis somática (Lambardi *et al.*, 1993); en cualquiera de los casos, la regeneración de plantas requiere de varias etapas que deben ser determinadas empíricamente; puesto que existen una serie de factores que influyen para lograr una respuesta exitosa (Thorpe, 2004; Lelu-Walter *et al.*, 2006).

4.13 Factores que influyen en la respuesta *in vitro*.

Los factores físicos ambientales influyen grandemente en el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Entre los principales factores a considerar en la propagación de coníferas se encuentran: luz, especie, tipo de explante, medio de cultivo y sacarosa entre otros

(Pierik, 1990 a y b; Thorpe, 1994).

4.13.1 Luz

La luz es uno de los factores físicos más importantes para el desarrollo *in vitro*. Tanto la duración (fotoperiodo) como la calidad (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que al influir en la síntesis y acumulación de ciertas sustancias, como las hormonas endógenas y el almidón, afectan el desarrollo del inóculo (Barba, 2001).

En *Pinus radiata* se comprobó que en los primeros 21 días del cultivo, es necesaria la luz para la formación óptima de brotes (Villalobos *et al.*, 1985). Trabajando con la misma especie Moller y colaboradores (2006) encontraron que la luz provocó un efecto estimulante en la diferenciación de los elementos vasculares y la actividad de enzimas relacionadas con el proceso de diferenciación en cultivo de callo. La actividad de las enzimas L fenilalanina amonio-liasa y cinamil alcohol-deshidrogenasa fue más alta con 16 h de fotoperiodo que los cultivos que crecieron en oscuridad.

Por otro lado, se ha comprobado que la ausencia de luz es necesaria para que se lleve a cabo la inducción de primordios de raíces en el género *Pinus* (Villalobos *et al.*, 1983).

4.13.2 Especie.

En los últimos años se ha trabajado con diversas coníferas; aunque las plántulas han sido regeneradas a partir de varias especies, una propagación masiva redituable ha sido establecida solamente para un número limitado de éstas Sen *et al.*, (1994), ya que algunas son consideradas como especies recalcitrantes (Charbonneau, 2004).

Por otro lado, para lograr desarrollar un sistema de micropropagación en coníferas, es necesario adaptar un protocolo modelo ya establecido y modificarlo, para cada especie en particular Jong y Tainer (1991); puesto que el éxito con un sistema organogénico determinado no es garantía para asegurar una respuesta favorable en otra especie (Bergmann, 1992). Los resultados obtenidos por Park y colaboradores (2006),

demuestran que los efectos del genotipo tuvieron una gran influencia sobre la respuesta *in vitro*. Por su parte, Bonson y Dixon, proponen en 1991 un protocolo para la propagación de *Pinus elliotti* utilizando cotiledones pueden producir mas de 100 plantas por embrión.

4.13.3 Inóculo o explante.

Otro de los factores más críticos para la propagación de coníferas es el explante (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987); debido a que varios tejidos de la misma planta en diversos estadios de desarrollo, difieren en su respuesta cuando son cultivados *in vitro*.

En gran número de especies se han utilizado como explante embriones cigóticos maduros e inmaduros, cotiledones, yemas, acículas y meristemas apicales (Reilly y Washer, 1977; Tautorus *et al.*, 1991; Niella y Rocha, 2001; Prehn *et al.*, 2003; Sul y Korban, 2004).

En 1994, Harry y Thorpe obtuvieron exitosamente la inducción de yemas y brotes utilizando embriones completos de *Pinus banksiana* Lamb. Así mismo, Sen y colaboradores (1994), así como Niella y Rocha (2001), reportan la inducción de brotes *in vitro* a partir de cotiledones de embriones cigóticos. Por su parte, trabajando con embriones cigóticos de *Pinus radiata*, Hargreaves *et al.*, (2005), menciona que mediante la técnica de multiplicación de brotes axilares es posible llegar a producir varios miles de plantas después de un año en cultivo *in vitro*. Así mismo, Ojeda (1996), utilizando

por su parte, cotiledones de embriones maduros con diferentes concentraciones y tipos de citocininas, obtuvo la regeneración de *Pinus cembroides* y *P. halepensis*.

Sin embargo, Kulchetski *et al.*, (1993) trabajando con explantes cotiledonares en *Abies amabilis*, usando el medio de Shenck y Hildebrand (1972), suplementado con 10 μ M de BA, no obtuvieron una propagación *in vitro* exitosa. Así mismo, Tampe, (1996) estudiando la respuesta *in vitro* de cotiledones de *Pinus radiata* a diferentes concentraciones de ácido jasmónico, observó que este regulador inhibió el proceso de organogénesis.

4.13.4 Influencia de la sacarosa en el medio de cultivo.

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% al 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede remplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa. En general la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Roca y Mroginski, 1991; Merino, 1988; Pierik, 1990a)

En coníferas se utiliza un rango que oscila entre 2 a 3% de sacarosa: por ejemplo Hargreaves *et al.*, (2004) utilizó una concentración de sacarosa del 2% en el medio GD, para la regeneración de brote de *Pinus radiata*. En otro experimento con *Picea chihuahuana* la han utilizado a razón de 3% como fuente de carbono en el medio de SH, para la inducción de brotes (Mata *et al.*, 2001b). Así mismo, se ha utilizado con éxito en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* a razón de 2 y 3%, en la inducción y alargamiento

de yemas así como en la multiplicación de brotes (Ojeda, 1996). En otras especies de pinos las concentraciones óptimas de sacarosa varían entre 0.5 y 2% (Halos y Go, 1993)

4.13.5 Medio de cultivo.

En la propagación *in vitro* de Pináceas regularmente se han utilizado medios en donde varía la concentración de sales orgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento, tipo de agente gelificante, pH, concentración de sacarosa y agentes antioxidantes (Tautorus, 1991; Tang *et al.*, 2004c). por lo que, existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan con frecuencia en la micropropagación de coníferas: MS (Murashige y Skoog, 1962), DCR (Gupta y Durzan, 1985), GD (Gresshoff y Doy, 1972), SH (Schenck e Hildebrand, 1972), B₅ (Gamborg *et al.*, 1965), ER (Ericsson, 1965), HE (Heller's, 1953), Wh (White, 1943), TE (Tang y Ouyang, 1999). Según se menciona éstas fórmulas generalmente recibieron su nombre del investigador que las dio a conocer a la ciencia (Roca y Mroginski, 1991; Tang *et al.*, 2004 b).

4.13.5.1 Efectos de las sales inorgánicas en la respuesta *in vitro*

Para crecer, las células requieren de nutrientes orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Generalmente los nutrientes inorgánicos se clasifican como macro y micronutrientes; y son utilizados para elaborar las formulaciones o medios de cultivo básicos (Pierik, 1990a; Roca y Mroginski, 1991). En diversos estudios se compararon 5 formulaciones de sales inorgánicas para inducción de yemas en *Picea*

rubens. Lu y colaboradores (1991) encontraron que tanto el tipo como la concentración del medio básico son importantes para la fase de inducción. Así mismo, Ojeda (1996), al comparar el medio DCR contra el GD reportó una diferencia significativa en el desarrollo de brotes en *Pinus cembroides* y *P. halepensis*, observando una mayor respuesta en la formación de brotes en el medio DCR en ambas especies en comparación con el GD. En *Pinus strobus*; se comparó la capacidad de formación de brotes con el medio SH al 100% de su concentración (Flinn *et al.*, 1985). Por su parte, (Mata *et al.*, 2001b), utilizando el mismo medio al 50% de su concentración original y sin reguladores de crecimiento obtuvieron la inducción de brotes adventicios en *Picea chihuahuana*.

4.13.5.2 Respuesta a los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

El éxito en la propagación *in vitro* es obtenida por la estimulación de los explantes en cultivo. Esto por lo general se logra a través de los reguladores de crecimiento incluidos en el medio. Generalmente, tanto las auxinas como las citocininas son necesarias para el cultivo de brotes *in vitro* de coníferas (Atree y Fowke, 1991; Roca y Mroginski, 1991). Por ejemplo, en *Pinus massoniana* las yemas adventicias se diferenciaron de embriones cigóticos cultivados en el medio DCR adicionado con 0.5 mg^l⁻¹ de BA y 0.05 mg^l⁻¹ del AIB (Zhang *et al.*, 2006).

En experimentos con *Pinus halepensis* fue estudiada la respuesta de diferentes citocininas como BA, Cinetina, Zip y Zeatina sobre la inducción de yemas adventicias; todas las citocininas fueron aplicadas a razón de (1.0, 2.5, 5.0 y 10 µM). La mejor

citocinina resultó ser BA (Lambardi *et al.*, 1993). Por otro lado, Mata *et al.*, (2001b), estudiaron la respuesta de BA y Kin sola o conjuntamente con ANA y 2,4-D. Los brotes adventicios fueron obtenidos principalmente de la región cotiledonar a partir de una amplia gama de concentraciones de reguladores de crecimiento; la cinetina fue más eficaz que BA en la inducción de brotes en *Picea chihuahuana*, a diferencia de lo observado por Lambardi *et al.*, (1993). Durante el proceso de formación de brotes, se producen cambios fisiológicos y bioquímicos en los tejidos. Se considera en general, que las citocininas promueven la formación *in vitro* de centros meristemáticos que llevan a la diferenciación posterior de yemas y brotes (Hiriart, 1991; Winkler, 1995).

Investigaciones previas en pinos (Renfoe y Berlyn, 1985), han demostrado que los niveles de citocininas usados para la inducción adventicia, puede provocar la síntesis de altos niveles de ADN. Se han estudiado los cambios metabólicos provocados por la adición de BA a cotiledones de *Pinus* y se ha concluido que para la formación de brotes

se requirió de un incremento en la producción de ácidos nucleicos (Moncalean *et al.*, 2006; Stasolla *et al.*, 2007).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.13.5.3 Organogénesis en coníferas.

La organogénesis es uno de los sistemas de propagación *in vitro* más utilizado en coníferas, el cual comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos (Roca y Mroginski, 1991; Lambardi *et al.*, 1993; Schestibratov *et al.*, 2003). Se ha consignado la estimulación de yemas

adventicias por medio de organogénesis: siendo este uno de los sistemas de propagación *in vitro* que ha tenido mucho éxito (Thorpe y Biondi, 1984; Capuana, 2001).

La organogénesis indirecta, puede obtenerse a partir de callo, controlando la iniciación de un primordio por medio de la manipulación de los nutrientes y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Por lo tanto, las plántulas regeneradas a partir de un cultivo de callo pueden mostrar variabilidad (Narayanaswamy, 1977; Patel y Berlyn, 1982). Mediante ésta técnica se han obtenido brotes de *Pinus radiata* y *Pinus virginiana* respectivamente (Schestibratov *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004c). De igual manera, se ha establecido un protocolo de micropropagación eficiente de *Pinus elliottii*, logrando la diferenciación de numerosos brotes adventicios a partir de callo, en diferentes medios de cultivo adicionados con BA, TDZ y AIB (Tang *et al.*, 2006).

Sin embargo, la organogénesis directa es la técnica de proliferación de brotes adventicios más utilizada en sistemas de micropropagación. Para lograr lo anterior, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento son optimizados para lograr las máximas tasas de multiplicación (Phillips *et al.*, 1995); por lo que se deben desarrollar protocolos para cada especie en particular (Thorpe, 2004; Hargreaves *et al.*, 2005).

4.13.5.3.1 Etapas de la ruta organogénética en coníferas.

El desarrollo de plantas *in vitro* puede ser dividido en diversas etapas o fases. Estas fases fueron descritas primeramente por Murashige (1974) y han sido adaptadas para una gran variedad de especies vegetales ya sea para fines de investigación o a nivel

comercial. Aunque inicialmente Murashige describe tres etapas para la micropropagación, otras dos fases o etapas pueden ser añadidas al proceso, quedando de la siguiente manera: Etapa 0. Selección y preparación de la planta donadora. Etapa I. Establecimiento del cultivo aséptico. Etapa II. Multiplicación de propágulos. Etapa III. Enraizamiento *in vitro*. Etapa IV. Enraizamiento *in vivo* y Aclimatación (Pierik, 1990a). Por su parte, Villalobos *et al.* (1983) describen cuatro etapas en la formación de plantas de coníferas *in vitro*: etapa 1) iniciación de las yemas; etapa 2) paso de las yemas a brotes; etapa 3) enraizamiento de los brotes y etapa 4) transplante a suelo.

Con respecto a las fases correspondientes de la organogénesis en coníferas, diversos autores consideran, generalmente 4 etapas o fases de desarrollo, y cada una requiere manejo por separado (Von Arnold y Ericsson, 1981; Gladfeldter y Phillips, 1987; Thorpe *et al.*, 1990; Saborio, 1996).

La ruta organogénica para la regeneración de coníferas involucra las siguientes fases:

- a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias
- b) Alargamiento de yemas
- c) Multiplicación de brotes
- d) Enraizamiento

(Lambardi *et al.*, 1993; Harry y Thorpe, 1994; Hargreaves *et al.*, 2005).

a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias.

La optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo.

En ésta etapa, producto de la dediferenciación, es donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénético o embriogénético; donde las células se determinan para formar un órgano o embrión. Generalmente, el tejido seleccionado se siembra en un medio de cultivo con alto contenido de sales minerales y se complementa con citocininas. En algunos casos, se utilizan bajos niveles de algunas auxinas (Thorpe y Biondi, 1984; Flinn *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2006).

Existen trabajos de investigadores que han estudiado los diferentes factores que pueden afectar la inducción y desarrollo de yemas adventicias, por ejemplo (Pérez-

Bermúdez y Sommer, 1987) observaron que los embriones de *Pinus elliottii* sobre medio sólido conteniendo citocinina, respondieron a partir de la primera semana. La proliferación celular se inició a partir de los cotiledones y algunas veces de la porción del hipocotilo que estaba en contacto con el medio de cultivo. Después de 4 a 5 semanas se observó el desarrollo de yemas a partir de los embriones.

Así mismo, Hargreaves *et al.* (2004), trabajando con cotiledones de 72 genotipos de *Pinus radiata* en el medio de cultivo LP adicionado con 5 mg^l⁻¹ de BA y 3 % de sacarosa, observaron que entre 79 al 89% de los genotipos formaron brotes. Saborío determinó en 1996 las condiciones requeridas para la inducción de yemas y el desarrollo

de plantas a partir de embriones de *Pinus ayacahuite*. Tal inducción se logró a partir de cotiledones que fueron cultivados por 2 semanas en el medio Bormman adicionado con 50 micromolar de BA y 3% de sacarosa: obteniendo la formación de yemas en el 75 % de los cotiledones cultivados. De forma similar, Sul obtuvo en 1995 el establecimiento y proliferación *in vitro* de *Sequoia sempervirens* mediante el cultivo de cotiledones en el medio MS adicionado con 30 mg.l⁻¹ de BA, logrando una frecuencia de regeneración de más del 90%.

Por su parte, Chesick *et al.* (1991) compararon 6 niveles de BA (0, 1, 5, 10, 20 y 50 μ M), para inducción de yemas y alargamiento de brotes en *Pinus strobus*. Encontrando que ningún embrión sobrevivió a los 5 meses sin BA; el promedio más alto para producción de brotes se observó al nivel 5 μ M (79%) y los promedios tendieron a disminuir con el incremento de BA, llegando incluso a presentarse un efecto perjudicial significativo a la concentración de 50 μ M.

En otros trabajos con *Pinus caribaea*, se probaron niveles de BA a concentraciones de (8.9, 22.2, 44.4 y 67.7 μ M) para inducción y desarrollo de brotes. El número promedio de brotes por explante que sobrevivieron, fue de 9 brotes/embrión en los tratamientos con (8.9, 22.2 y 44.4 μ M BA); el mayor número de brotes/embrión fue de 10 a razón de 67.7 μ M BA (Halos y Go, 1993). Así mismo, Liao (1993), cultivando cotiledones durante 14 días en medios adicionados con 44 μ M de BA, obtuvo la formación de brotes adventicios en *Pinus elliotti*. Sin embargo, el alargamiento de los

brotos en esta especie ha resultado inhibido cuando se usan concentraciones de 44.4 y 67.7 μM de BA (Halos y Go, 1993).

Por otro lado, con la finalidad de determinar el rango óptimo para inducción de yemas en *Pinus eldarica*, se ha evaluado el efecto de las citocininas Kin, 2ip y BA a concentraciones de 11, 22, 44 y 66 μM (Sen *et al.*, 1994). En general las concentraciones mayores de 40 μM resultan perjudiciales para la producción de brotes; la concentración de 22 μM fue óptima para producir una mejor respuesta. En ésta investigación la BA resultó la más efectiva para la inducción de yemas.

En el caso *Picea chiuahuana* (especie endémica del norte de México) se ha logrado la inducción de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros (Mata *et al.*, 2001b), los cuales fueron cultivados en el medio de cultivo SH con la adición de un amplio rango de concentraciones de BAP, 2ip y Kin, obteniendo 11.2 yemas adventicias por embrión en promedio al adicionar 23 μM de Kin

b) Alargamiento de yemas.

Una vez concluida la etapa de inducción de yemas, es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Aitken-Chistie *et al.*, 1987; Harry y Thorpe, 1994).

7. DISCUSIÓN

7.1 Establecimiento aséptico de los explantes

La versatilidad de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* y su aplicación a especies leñosas constituye una opción para salvaguardar los recursos genéticos por medio de la técnica de organogénesis (Capuana 2001). Por lo que, el establecimiento aséptico de los explantes es considerada una etapa determinante para lograr la regeneración exitosa de cualquier especie (Roca y Mroginski, 1991).

En la presente investigación, la técnica de desinfección resultó ser adecuada, logrando 0 % de contaminación en todos los tratamientos. Así mismo, se obtuvo 100% de supervivencia en explantes.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.2 Inducción de primordios de yemas

La inducción de yemas adventicias es uno de los sistemas de micropropagación para coníferas que se han desarrollado con éxito (Thorpe y Biondi, 1984; Charbonneau, 2004). En el presente trabajo, se observaron cambios iniciales desde los primeros 5 días del establecimiento *in vitro*; se presentaron indicios de oxidación y cambios en la coloración de embriones y cotiledones. Estos resultados son similares a lo consignado

Gresshoff PM, Doy CH. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta*. 107: 161-170

Grout BWW. 1995. Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues and organs. En: B. Grout (Ed). *Genetic Preservation of Plant Cell In Vitro*. Springer - Verlag 1-20.

Gupta PK, Durzan DJ. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell. Rep.* 4: 177-179.

Halos SC, Go NE. 1993. Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 47-57.

Hargreaves CL, Grace, Holden DG. 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata*. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell. Rep.* 21: 40-45.

Hargreaves CL, Grace, Van der Maas S, Reeves C. 2004. Cryopreservation of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. *Canadian Journal of Forest Research* 34:600-609.

Hargreaves CL, Grace, Van der Maas S, Menzies MI. 2005. Comparative *in vitro* and early nursery performance of adventitious shoots from cryopreserved cotyledons and axillary shoots from epicotyls of the same zygotic embryo of control-pollinated *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research*. 35: 2613-2629.

Harry IS, Thorpe TA. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of Jack pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 37: 159-164.

Hartmann H, D Kester. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 7ª ed México D.F. Editorial Continental S.A. p. 760.

Hiriart AM. 1991. Effect of cytokinins on tissue structure, plastid development and photosynthetic proteins in tissue culture of *Pinus ponderosa* Dougl. cotyledons during organogenesis. Ph. D. Dissertation. The University of British Columbia, Canada. 135 p.

Jang JC, Tainter FH. 1991. Micropropagation of shortleaf, Virginia and loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25: 61-67.

Kulchetscki LI, Harry S, Yeung EC, Thorpe TA. 1993. *In vitro* regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. *Tree Physiology*. 15: 727-738

Lambardi M, Sharma KK, Thorpe TA. 1993. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of alepo pine (*Pinus halepensis* Mill). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 189-199.

Lawrence GHM. 1971. *Taxonomy of Vascular Plants*. The Macmillan Company: New York, pp. 354 - 364.

Ledig FT. 1988. The Conservation of diversity in forest tree: Why and how should genes be. *C. Biosciencia.* 38: 471.

Ledig FT, Capó-Arteaga MA, Hodgskiss DP, Sbay H, Flores-López C, Conkle MT, Bermejo-Velazquez B. 2001 Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinaceana* and a comparison with *Pinus maximartinezii* (pinaceae). *American Journal of Botany* 88:1977 -1987.

Ledig FT, Conkle MT, Bermejo-Velazquez B, Eguiluz-Piedra T, Hodgskiss PD, Johnson DR, Dvorak WS. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: Genetic diversity disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii* evolution 53: 191-199.

Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K. 2006. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait). *Plant Cell Rep.* 25: 767-776.

Liao YK. 1993. Development of *in vitro* regeneration and gene transfer systems for conifer species. Ph.D. Dissertation, University of Illinois, Urbana Champaign, USA, 127.

Lin X, Leung DWM. 2002. Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don, Part I: Factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 38:191-197.

López ML. 1998. Regeneración, crecimiento y dinámica poblacional del pino azul *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Resumen del proyecto de investigación H140. CONABIO- Colegio de Posgraduados . Montecillos, Texcoco, México.

Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. 1991. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.) *Bot. Gaz.* 152: 42-50.

Martínez - Pulido C, Harry IS, Thorpe TA. 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 29: 247-255.

Martínez M. 1963. *Las pináceas Mexicanas*. U. N. A. M. México. pp11-39.

Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou. *Pinus armandii* Franch. Var. *amamiana* (Koidz). Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 43: 28-34

Mata LL. 2001 a. Proteins, amino acids and fatty acids composition of nuts from the Mexican endemic rarity, *Pinus maximartinezii*, and its conservation implications. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela. 12.

Mata MR, Chávez VM, Boettler RB. 2001 b. *In Vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In Vitro Cellular and Develop. Biol.-Plant*. 1:73-79.

McKeand SE, Allen HL. 1984. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. *Physiol. Plant*.61: 523-528.

Menzies ML, Aimers-Hilliday J. 1997. Propagation options for clonal forestry with *Pinus radiata*. In proceedings of IUFRO 97: Genetics of radiata pine, 1-5.

Merino ME. 1988. Medio de cultivo. En M.D. Hurtado, Y.M.M. Merino. (Ed). Cultivo de tejidos vegetales. Ed: Trillas. México. D. F. pp 70.

Moller R, Ball RD, Henderson AR, Modzel G, Find J. 2006. Effect of light and Activated Charcoal on Tracheary Element Differentiation in Callus Cultures of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Tissue and organ culture*. 85:161-171.

Moncalean P, Alonso P, Centeno ML, Cortizo M, Rodríguez A, Fernández B, Ordas RJ. 2005. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree physiology* 25:1-9

Mott RL, Amerson HV. 1981. Tissue Culture Plantlets Produced From *Pinus monticola* Embryonic Materials. *Forest Res*. 27: 299-304.

Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann.Rev. Plant Physiol*. 25: 135-166.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-499.

Murashige T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. University of Calgary. Canada. 15-27.

Nairn BJ. 1992. Commercial micropropagation of radiata pine. In *Micropropagation of woody plants*. *For. Sci*. 41:383-394.

Narayanaswamy S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. En: J. Reinert & Y.P.S. Bajaj Ed.) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag. Berlin. 179-206.

Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L. 2005. Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 701-717.

Niella F, Rocha P. 2001. Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. in the Northeast region of Argentina. Proceedings of the 26 Th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. Georgia University, Georgia, USA. 32-38.

Niemi K, Scagel C, Haggman H. 2004. Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78: 83-91.

Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial.

Ojeda ZC. 1996. Inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 44-47 pp.

Oliveira P, Barriga J, Cavaleiro C, Peixe A, Potes AZ. 2003. Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry*. 76:579-587.

Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM. 2006. Initiation of somatic embryogenesis In *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 87-101.

Patel KR, Thorpe TA. 1994. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta*) Dougl. ex Loud.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3:131-142.

Patel KR, Berlyn GP. 1982. Genetic instability of multiple buds of *Pinus coulteri* regenerated from tissue culture. *Can. J. For. Res.* 12:93-101.

Pelletier G, Laliberte S. 2000. Effect of embryo orientation on the developmental sequence of adventitious organogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). *Can. J. Bot.* 78: 1348- 1360.

Pence VC. 1991. Center for reproduction of endangered wildlife. TCA Report 25:1-2.

Pérez-Bermúdez P, Sommer HE. 1987. Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliotii* (Engelm) embryos cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11:25-35.

Phillips GC, Hubstenberger JH, Hansen EE. 1995. Adventitious Shoot Proliferation. En: Gamborg, O.L. Phillips. Plant Cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods. Springer-Verlag, Berlin. 55-61.

Pierik RLM. 1990 a. Rejuvenation and Micropropagation. International Association of Plant Tissue Culture Newsletter. 62:11-21.

Pierik RLM. 1990 b. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. pp 109 -110.

Prehn D, Serrano C, Mercado A, Stange C, Barrales L, Arce- Jonson P. 2003. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 91-94.

Quintero QI. 1996. El pino piñonero de Juchipila o piñón azul (*Pinus maximartinezii* R.). http://www.juchipila.com/pinus_maximartinezii.php. [Revisado el 06 /mayo/2003].

Reilly K, Washer J. 1977. Vegetative propagation of *Pinus radiata* by tissue culture: plantlet formation from embryo tissue. N.Z.J. For. Sci. 7:199-206.

Renfoe MH, Berlyn OP. 1985. Variation in nuclear DNA content in *Pinus taeda* L. tissue cultura of diploid origin. J. Plant Physiol. 121:131-139.

Richards S, Gauthier S, Laliberte S. 1995. Isozyme assessment of the genetic stability of micropropagated hybrid larch (*Larix xeuampleps* Henry). Can. J. For.Res:1103-112.

Roca WM, Mroginski LA. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. pp 152-153.

Ruiz GRR, Márquez MM, Ledesma MJC, Blanco FM, Valdez RVC, Pérez VGP. 2006. Estado y Conservación del Pino Azul (*Pinus maximartinezii* Rzed.) y sus especies asociadas en la sierra de Juchipila, Zacatecas. Centro regional Universitario Centro Norte; Universidad Autónoma Chapingo. Méx.

Rzedowski J. 1978. Vegetación de México Ed. Limusa. México, D. F. pp 285-313.

Rzedowski J. 1964. Una especie nueva de pino piñonero del Estado de Zacatecas. (México). Ciencia, México, D.F. XXIII. pp 17 – 24.

Saborio FJ. 1996. Organogénesis in pine species: Micropropagation and molecular analysis of bud induction *in vitro*. Ph. D. Dissertation. University of Calgary, Canada. 355.

Saborio FJ, Dvorak WS, Donahue JK, Thorpe TA. 1997. *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree physiology* 17: 787-796.

Saravitz CH. 1990. *In vitro* propagation of Fraser fir (*Abies fraseri*) and Virginia pine (*Pinus virginiana*) from embryonic explants. Ph.D. Dissertation, North Carolina State University. 108.

Schenk RU, Hildebrandt AC. 1972. Medium and technique for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

Schestibratov KA, Mikhailov RV, Dolgov SV. 2003. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 72: 139-146.

Selby C, Seaby DA. 1982. The effect of Auxins on *Pinus contorta* seedling root development. *Forestry*. 55:125-135.

SEMARNAT. 2003. Sistema Estatal de las Áreas Naturales protegidas para la conservación de la biodiversidad en Zacatecas. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Delegación Federal en el Estado de Zacatecas. México

Sen S, Magallanes – Cedeño ME, Kamps RH, Mckinley CR, Newton RJ. 1994. *In vitro* micropropagation of Afghan pine. *Can. J. For. Res.* 24: 1248-1252.

Snedecor GW, Cochran WG. 1971. Métodos estadísticos. Ed: Continental, México, D.F. pp. 402.

Sommer HE, Brown CL, Kormanik PP. 1975. Differentiation of Plantlets in Longleaf Pine (*Pinus palustris* Mill) Tissue Cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.* 136: 196-200.

Stasolla C, Loukanina N, Ashihara H, Yeung EC, Thorpe TA. 2007. Comparative studies on pyrimidine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* during shoot formation *in vitro*. *Journal of Plant Physiol.* 164: 429-441.

Sul IW, Korban SS. 2004. Effects of salt formulations, carbon sources Cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus Pinea* L. *Plant growth regulation.* 43:197-205.

Sul W. 1995. Development of *in vitro* regeneration and gene transfer systems from conifer species. Ph.D. Dissertation. University of Illinois Champaign, USA.127.

Tampe PA. 1996. Effects of jasmonic acid on plant morphogenesis *in vitro*. MSc. Dissertation. University of Calgary, Canada. 154.

Tang W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ. 2004 a. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibition in the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana*). Plant Cell Rep. 2: 871-877.

Tang W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ. 2004 b. The effect of different Plant growth regulators on adventitious shoot formation from Virginia Pine (*Pinus virginiana*) zygotic embryo explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 237-240.

Tang W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ. 2004 c. The effect of different Plant growth regulators on *in vitro* adventitious shoot formation in Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 59: 2067.

Tang W, Newton RJ, Charles MT. 2006. Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). Journal of Plant Physiology. 163: 98-101.

Tautorius TE, Fowke LC, Dunstan DI. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. Can. J. Bot. 69: 1873-1899.

Thorpe TA, Biondi S. 1984. Conifers. In: Sharp, W.R. D.A. Evans, P.A. Ammirato, Y. Yamada (eds). Handbook of plant cell culture. Crop Species. Macmillan Publishing Company. 2: 435- 470.

Thorpe TA. 1994. Morphogenesis and regeneration. In: Handbook of Plant Cell Tissue Culture. L.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), Publishers, Netherlands. 17-36.

Thorpe TA. 2004. To root or not to root, that is the question: Reflections of a developmental plant physiologist. In vitro Cell. Develop. Biol.- Plant. 40: 115-128.

Thorpe TS, Harry IS, Kumar P. 1990. Application of micropropagation to forestry. In: Micropropagation: technology and application. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds). Kluwer, Academic. Dordrecht, The Netherlands. 311-336.

Toivonen PMA, Kartha KK. 1989. Cryopreservation of cotyledons of non-germinated white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) embryos and subsequent plant regeneration. J. Plant Physiol. 134:766-788.

Vargas HJ. 2003. Estado de la diversidad genética de los árboles y bosques en el Norte de México. En: Documento de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales. FAO. Roma, Italia. 38 p.

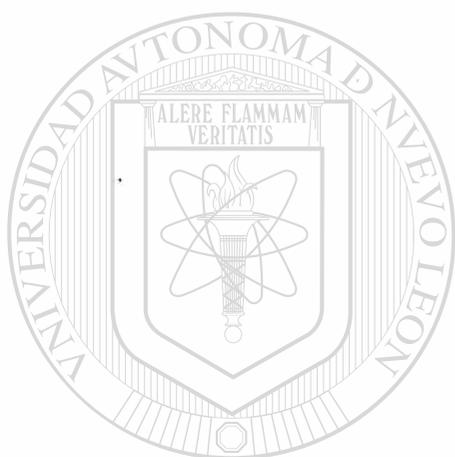
Villalobos VM, Yeung EC, Thorpe TA. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. Can. J. Bot. 63: 2172-2176.

Villalobos VM, Thorpe TA, Yeung EC. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. Conacyt. México. 51:43-59.

Von Arnold S, Ericsson T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59: 870-974.

Winkler MN. 1995. Physiology of shoot formation *in vitro*: Aminoacid metabolism and respiration. Ph.D. Dissertation. University of Calgary, Canada. 235.

Zhang Y, Wei ZM, Xi ML, Shi JS. 2006. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine. (*Pinus massoniana*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84:119-123.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías

Candidata para el Grado de

Doctora en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

TESIS: Regeneración *in vitro* del piñón azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski)

CAMPO DE ESTUDIO: Ciencias de la Vida

DATOS PERSONALES: Nacida en Jéruco Michoacán, el 01 de agosto de 1966; de padres Juan Isaias Ojeda Lázaro (†) y Margarita Zacarías Peredo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León recibiendo el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en febrero de 1992 y Obteniendo el grado de maestro en Ciencias en Producción Agrícola en septiembre de 1996, en la misma Universidad.

EXPERIENCIA PROFESIONAL: Asesora en la Secretaría Académica de la Torre de Rectoría 9° Piso, UANL de enero de 2001 a mayo de 2004.. Asesora Técnica en el Programa Elemental de Asistencia Técnica del Subprograma de Alianza para el Campo; SAGAR Nuevo León de noviembre de 1999 a abril de 2000.. Auxiliar de investigación en los Laboratorios de Fisiología Vegetal, Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética. Facultad de Agronomía; UANL de enero de 1988 a diciembre de 2001.

Proyectos en colaboración: Conservación de Especies Amenazadas o en Peligro de extinción (cactáceas). apoyado por CONACYT. Micropropagación de especies forestales en colaboración con la Universidad de Texas A&M. Micropropagación de orquídeas en colaboración con la estación experimental de Texas A&M y Establecimiento del Protocolo para la Crioconservación de Germoplasma de Aguacate Criollo (*Persea americana* Mill) apoyado por PAICYT.

Grupos de investigación a los que pertenece: Colaboradora del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Programa de Mejoramiento del Profesorado. Clave: UANL- CA- 228. Y Asesor externo de la tesis Estabilidad genética en cultivo *in vitro* de aguacate criollo. Facultad de Agronomía de la UANL..

Estancias: Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales, en el Departamento de Ciencias Forestales de la Universidad de Texas A&M.

Experiencia en educación: Maestra del curso “Cultivo de tejidos vegetales y Micropropagación de plantas” Facultad de Agronomía de la UANL Mayo de 1994 y Enero de 1997. Docente del Instituto Tecnológico de Nuevo León. Julio de 1999 a la fecha. Publicaciones en revistas indexadas 4, resúmenes en extenso 2, ponencias en congresos 10.

Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul

Pinus maximartinezii (Rzedowski)

(Con 3 Tablas)

In vitro multiplication of the Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski)

(With 3 Tables)

Ojeda-Zacarias¹ Ma del Carmen, Hugo A Luna-Olvera², Lilia H Morales-Ramos², María J Verde-Star², Teresa E Torres-Cepeda², Benito Pereyra-Alfárez², Leobardo Iracheta-Donjuan³, Emilio Olivares-Sáenz⁴, Raúl Salazar-Sáenz⁴, Elizabeth Cárdenas-Cerda⁴

Resumen. *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica en peligro de extinción, confinada a una población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en una superficie de 400 ha. En estos casos, es necesario establecer técnicas de propagación que permitan incrementar la disponibilidad del material vegetativo.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de *Pinus maximartinezii* por medio de organogénesis. Embriones cigóticos y cotiledones obtenidos de semillas maduras fueron colocados en los medios de cultivo DCR y CD adicionados con 0.3 mg/l y 0.5 mg/l de BAP; 0.01 mg/l de NAA, permaneciendo por 6 semanas en condiciones de 26°C ± 2°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Posteriormente los explantes fueron transferidos a los medios de cultivo (DCR y CD) sin reguladores de crecimiento a intervalos de 15 días, durante 6 semanas. En la siguiente etapa (alargamiento de yemas), la variable evaluada fue número de explantes con yemas. Por último los explantes fueron transferidos a los mismos medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1% de carbón activado, permaneciendo por 8 semanas; evaluándose posteriormente el número de brotes por embrión.

Los análisis de varianza mostraron diferencia significativa en medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento.

Abreviaturas: BAP=Bencilaminopurina; NAA=Ácido Nafalenacético; DMS=Diferencia Mínima Significativa; DCR=(Gupta y Duzan, 1985); GD=(Gesshoff y Doy, 1972); mg/l= miligramos por litro; g/l= gramos por litro; h= horas.

¹ Instituto Tecnológico de Nuevo León, Eloy Cavazos No 2001, Guadalupe, Nuevo León, CP 67170.

² Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Apdo Postal 38F, Pedro de Alba, s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, CP. 66450.

³ Investigador del Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico Chiapas, Méx. CP. 30870

⁴ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Carretera Zuazua-Marín Km 17.5, Marín, N.L., CP. 66700, e-mail ojedadz@yahoo.com.mx

Agradecimiento: al Consejo Nac. De Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado en la realización de mis estudios Doctorales.

Recibido 24.III.2006; aceptado 31.VIII.2006

Palabras clave: Micropropagación, coníferas, Piñón azul, primordios foliares, organogénesis

Abstract. *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) is an endemic endangered species, confined to a single population of approximately 2000 to 2500 mature trees. It covers about 400 ha in southern Zacatecas, Mexico. The success of tissue culture techniques for germplasm preservation depends on regeneration of cultures. The objective of this study was to achieve an *in vitro* proliferation protocol using organogenesis technique for *Pinus maximartinezii*. Mature seeds were surface sterilized in 6% H₂O₂ v/v. Isolated cotyledons and zygotic embryos were cultured on shoot induction media. DCR and GD media were supplemented with 0.3 and 0.5 mg l⁻¹ BAP; 0.01 mg l⁻¹ ANA and vitamin solution. Explants were incubated at 26 ± 2°C under a 16h photoperiod. The explants were transferred every 15 days to hormone-free medium (DCR and GD) for a period of 6 wk for bud development. The number of explants forming buds was determined. After induction of buds, the explants were transferred to a hormone-free basal medium, to which 0.1% activated charcoal was added. After 8 wk, the number of shoots per embryo was evaluated. Effects of either basal media or plant growth regulator concentrations were significantly different ($p < 0.05$).

Abbreviations: DCR=Gupta & Durzan, 1985; GD=Gresshoff y Doy, 1972; BAP=bencilaminopurine; ANA=Nafialen acetic acid.

Key words: Micropropagation, conifers, Piñón Azul, foliar primordial, organogénesis

La importancia económica de los bosques de coníferas en México es muy grande; el género *Pinus* constituye la mayor parte de la riqueza forestal por su amplio rango de distribución (Martínez, 1953). El piñón azul o maxi piñón (*Pinus maximartinezii* (Rzedowski), ha sobrevivido a una restricción genética extrema ya que está confinado a una sola población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en el sur del estado de Zacatecas, México y se encuentra en la lista de las especies en peligro de extinción (Ledig et al., 1999; Norma Oficial Mexicana, 1994).

En estos casos la propagación *in vitro* ha demostrado ser un método exitoso para la conservación y mantenimiento de especies en peligro de extinción (Mata et al., 2001). Sin embargo, se han observado diferentes respuestas con la utilización de medios de cultivo y reguladores de crecimiento (Ojeda, 1992). Por lo que, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada una de las especies (Go et al., 1993; Saravitz, 1990). Diversos investigadores, utilizando cotiledones de embriones maduros encontraron que concentraciones distintas de benciladenina favorecen el desarrollo de brotes *in vitro* (Go et al., 1993; Hargreaves et al., 2004; Patel y Torphe, 1994). Así mismo, Niella y Rocha (2001) utilizando cotiledones provistos de hipocotilos obtuvieron una mayor respuesta con la utilización de BA. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la multiplicación *in vitro* de *Pinus maximartinezii*, estudiando la variable número de brotes por explante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de la semilla.- Se obtuvieron semillas intactas de conos maduros de *Pinus maximartinezii*. Para su desinfección se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ingrediente activo) y detergente durante 5 min; estas fueron cepilladas y lavadas con agua. Se seleccionaron semillas de aprox. 2.5 cm y se eliminaron las cubiertas. Posteriormente las semillas seleccionadas se llevaron a una campana de flujo laminar colocán-

dose en una solución de H2O2 de 12.5 vol durante 45 min; se enjuagaron con agua bidestilada esterilizada y se transfirieron a etanol 70% por un minuto; a continuación se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ing. activo) adicionado de 0.5cc de Tween-20 (poli-etileno sorbitan monovalente) durante 5 min. Finalmente se enjuagaron por 5 min con agua bidestilada esterilizada.

Se utilizaron los medios de cultivo DCR y GD (Gresshoff y Doy, 1972; Gupta y Durzan, 1985). Adicionados con 0.3mg⁻¹ y 0.5mg⁻¹ de BAP, respectivamente; 0.01mg⁻¹ de NAA; Sacarosa 30g⁻¹ para DCR y 20g⁻¹ para GD; 5g⁻¹ de agar gel y ajustándose el pH a 5.7. Se esterilizaron a 121°C y 1 atm. de presión durante 15 min. Los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos a los que se expusieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de *Pinus maximartinezii* para estudiar su respuesta *in vitro*.

Factor A Explante	Factor B Medio Cultivo	Factor C Concentración de reguladores de crecimiento mg ⁻¹	Número de tratamiento
Cotiledones	DCR	0.3	1
		0.5	2
	GD	0.3	3
		0.5	4
Embrión	DCR	0.3	5
		0.5	6
	GD	0.3	7
		0.5	8

Diseño del experimento.- Se utilizó un diseño totalmente al azar y con arreglo factorial 2³ factor A: explantes; factor B: medios de cultivo; factor C: concentración de los reguladores de crecimiento donde la variable dependiente a evaluar fue número de brotes por embrión.

Inducción de yemas.- Cotiledones de embriones maduros y embriones cigóticos completos fueron colocados en los tratamientos señalados, incubándose durante seis semanas por 16/8 h-luz, a 2000 lux y 26°C ± 2°C para la inducción de yemas.

Alargamiento de yemas.- Los cotiledones y embriones fueron transferidos a frascos con medio DCR ó GD sin reguladores de crecimiento y disminuyendo la sacarosa a la mitad de su concentración. En estas condiciones permanecieron por seis semanas. Al final de esta etapa se evaluó el número de yemas que presentaban al menos 2 primordios foliares bien desarrollados.

Formación de brotes.- Los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a los mismos medios de cultivo pero adicionados con 0.1% de carbón activado manteniéndose estos durante 8 semanas. Para esta etapa se evaluó la variable número de brotes por embrión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de yemas. En la primera semana de iniciado el cultivo los cotiledones presentaron la formación de estructuras nodulares semejantes a callos. Al transcurrir seis semanas en el medio se hicieron evidentes primordios de yemas.

Sin embargo no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para ningún factor. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El tiempo requerido para esta respuesta coincide con lo observado en otras especies de pino (Ojeda, 1992; Patel y Thorpe, 1994; Sen et al., 1994).

Tabla 2. Promedios obtenidos a las seis semanas en la etapa de alargamiento de yemas, evaluándose el número de primordios de yemas en *Pinus maximartinezii*.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
1.093 α	1.375 α	1.312 α	1.156 α	1.281 α	1.187 α

Formación de brotes. Para la evaluación del número de brotes se tomaron en cuenta solamente las yemas que mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados.

Tabla 3. Número de brotes promedio de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas en la etapa de formación de brotes.

Medio de cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
DCR	GD	0.3	0.5
4.031 α	2.844 β	2.969 α	3.906 β

En general el medio de cultivo DCR mostró mayores resultados ($p < 0.05$) que el medio GD (Tabla 3). Así mismo, al analizar la concentración de los reguladores de crecimiento se encontró mayor respuesta ($p < 0.05$) con 0.5 mg l^{-1} BAP en comparación con 0.3 mg l^{-1} (Tabla 3).

Aunque no es fácil definir la causa por la cual cotiledones provenientes de un mismo embrión presentan diferencias en su respuesta, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada especie de pino (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987). Algunas especies responden exitosamente a dosis bajas de BA y otras responden mejor a dosis mayores de citocininas (Saravitz, 1990). La respuesta observada del presente trabajo coincide con lo reportado por Niella y Rocha (2001). Estos Autores obtuvieron una mejor respuesta con altas concentraciones de BA utilizando cotiledones provistos de hipocotilos. Así mismo Ojeda (1992) y Lambardi et al. (1993) encontraron en *Pinus halepensis* que conforme se incrementó la concentración de BA, la respuesta de los explantes fue mayor.

La mayoría de las regeneraciones *in vitro* del género *Pinus* ha sido el resultado de la utilización de embriones maduros así como de la concentración de los reguladores de crecimiento (Martínez-Pulido et al., 1992; Patel y Thorpe, 1994). En general la mayor respuesta se obtuvo a partir de embriones cigóticos completos en el medio DCR utilizando 0.5mg l^{-1} de BAP.

REFERENCIAS

- Go NE, GD Pérez-Orosco, SC Halos, In vitro response of embryos from different provenants of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* morelet. Plant cell, tissue and organ culture 32 (1993) 1.
- Grosshoff PM, CH Doy, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Plants 107 (1972) 161.
- Gupta PK, DJ Durzan, Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant cell Rep 4 (1985) 177.
- Hargreaves C, L Grace, S Van der Maas, C Reeves, Cryopreservación of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. Canadian Journal of Forest Research 34 (2004) 600.
- Lambardi M, KK Sharma, TA Thorpe, Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill) In vitro cell Dev Biol 29 (1993) 189.
- Ledig FT, TM Conkle, B. Bermejo-Velazquez, T Eguluz-Piedra, PD Hodgskiss, DR Johnson, WS Dvorak, Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican oinyon: Genetic diversity disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii* Evolution 53 (1999) 191.
- Martínez M, Las pináceas Mexicanas. Sec Agric Ganad Subsec Recursos Forestales y de Caza. México (1953*) 362.
- Martínez-Pulido C, IS Harry, TA Thorpe, Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29 (1992) 247.
- Mata MR, V y M Chávez, RB Boettler, In Vitro regeneration of plantlets from in mature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. In vitro cellular y Developmental Biology; 1 (2001) 73.
- Niella F, P Rocha, Research and Development of vegetative Propagation Techniques for *Pinus* sp. In the Northeast Region of Argentina. Proceedings of the 26 Th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001. Ed: Jeffrey FD, Dean-Georgia University. Athens, GA, USA (2001) 32.
- Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-94, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial (16 de mayo de 1994), (2001) 2.
- Ojeda, Inducción de Organogénesis y Embringénesis Somática de *Pinus cembrioides* y *Pinus halepensis*. Tesis de Maestría. FA-UANL. Mty. México (1992) 44.
- Patel KR, TA Thorpe, In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl ex loud) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3 (1994) 131.
- Pérez-Bernández P, HE Sommer, Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliptica* (Engelm) embryos cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11 (1987) 25.
- Saravitz H, In vitro propagation of Fraser fir (*Abies fraseri*) and Virginia pine (*Pinus virginiana*) from embryonic explants. Ph.D Dissertation. North Carolina State University. (1990) 108.
- Sen S, ME Magallanes-Cedeño, RH Kamps, CR Mckinley, RJ Newton, In vitro micropropagation of Afghan pine. Can Jour For Res 24 (1994) 1248.

Crecimiento y Selección de Suspensiones Celulares de *Cenchrus ciliaris* L. Bajo Estrés Salino

(con 1 cuadro y 2 figuras)

Cárdenas-Cerda¹ Elizabeth, Ernesto Ruiz-Cerda²,
Ciro GS Valdés-Lozano¹, Francisco Zavala-García¹,
Rigoberto Vázquez-Alvarado¹, Ulrico López-Domínguez¹,
Ma. Carmen Ojeda-Zacarias³

Resumen. Con el objetivo de seleccionar líneas celulares de zacate buffel (*Cenchrus ciliaris*) para tolerancia a salinidad, se establecieron suspensiones celulares a partir de cultivo de callo, las cuales fueron sometidas a concentraciones de NaCl a razón de 0, 60, 120 y 180 mM durante un periodo de 36 días.

Las suspensiones resultantes fueron sometidas posteriormente a una concentración de 180 mM de NaCl. En subcultivo posterior se encontró que las suspensiones provenientes de los tratamientos con 60 y 120 mM de NaCl, presentaron mayores valores en el parámetro de peso fresco, comparado con el testigo.

Palabras claves: Zacate buffel, variación somaclonal, tolerancia a salinidad, selección *in vitro*

Abreviaturas: NaCl= Cloruro de Sodio; ppm= partes por millón; 2,4-D= 2,4-Diclorofenoxiacético; AIA= Ácido Indolacético; DMS= Diferencia Mínima Significativa; MS= Murashige y Skoog 1962; mM= mili Molar; rpm= revoluciones por minuto; meq= miliequivalente.

La "variación somaclonal", que se manifiesta en los individuos producto del cultivo de células somáticas de una planta, ha sido aprovechado para la selección de líneas celulares y mejoramiento de algunas especies cultivadas con características de resistencia tanto a factores de estrés

¹ Profesor - Investigador. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Carretera Zuazua - Marín, Km. 17, Marín, N. L., México

² Profesor - Investigador. Instituto Tecnológico Agropecuario N° 10 Torreón, Coahuila, México

³ Profesor - Investigador. Instituto Tecnológico de Nuevo León Av. Eloy Cavazos N° 2001, Guadalupe, N.L., México

Recibido 10 II.2004 - aceptado 23.III.2004

biótico como abiótico (7). Se han obtenido selecciones celulares con tolerancia a salinidad en: alfalfa y arroz (1); tabaco (10) y trigo (6).

El zacate buffel es una especie que ha mostrado un amplio rango de adaptación a diferentes ambientes ecológicos, incluyendo las zonas semidesérticas, en las que representa una alternativa de producción agrícola forrajera viable por su tolerancia a la sequía, además de una opción de interés para la cobertura de grandes extensiones de suelo subutilizadas. Sin embargo, dicha especie es considerada sensible a las condiciones de salinidad del suelo (2, 9, 5). En un estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (3) distintos genotipos de zacate buffel fueron fuertemente afectados en sus porcentajes de germinación en concentraciones superiores a 6000 ppm de NaCl. Por otra parte, Graham y Humphreys (2) observaron una reducción del rendimiento potencial de las variedades American, Tarewinnabar, Gayndah, Biloela y Molopo en una proporción inversa al incremento de sal, con tratamientos de 28, 44, 66, 110 y 125 meq^l⁻¹ de NaCl, con lo que concluyeron que el zacate buffel es poco tolerante a este factor, considerando que los cultivos sensibles son aquellos que prosperan en niveles salinos cuya conductividad eléctrica es menor de 4 mmhos cm⁻¹, equivalentes a 40 meq^l⁻¹ de NaCl.

El objetivo de este estudio fue caracterizar y seleccionar líneas celulares de zacate buffel en medios salinos, como una posible alternativa de mejoramiento genético de la especie por variación somaclonal.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la UANL, donde a partir de callo friable de la accesión PI-240170 de zacate buffel se establecieron suspensiones celulares en el medio de cultivo "MS" (8) adicionado con 1.0 mg^l⁻¹ de ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.3 mg^l⁻¹ de ácido Indolacético (AIA), 100 mg^l⁻¹ de mioinositol, solución de vitaminas y 30 g^l⁻¹ de sacarosa. Para lo anterior, se transfirieron 0.5 g de callo a matraces de 125 ml con 25 ml de medio. Los matraces fueron colocados en un agitador rotatorio a 130 rpm en el cuarto de incubación bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2° C) y luz (16/8 h).

A partir de las suspensiones celulares se estableció un experimento con distintas concentraciones salinas. Los tratamientos consistieron en someter subcultivos de las suspensiones celulares a 0, 60, 120 y 180 mM de NaCl en matraces de 125 ml con 30 ml de medio de cultivo. El procedimiento consistió en transferir bajo condiciones asépticas 0.5 g de células de la suspensión madre a los matraces tratados. Los matraces con las suspensiones celulares fueron colocados en condiciones de incubación a temperatura de 25 ± 2° C y luz de 16/8 h, en constante agitación a 130 rpm en un agitador rotatorio (Termolyne Orbital Shaker modelo M49235).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones y se llevaron a cabo muestreos cada 6 días por un período de 36 días. En cada muestreo se tomó aleatoriamente un matraz por tratamiento y repetición y se evaluó el peso fresco de las células, separándolas del medio líquido mediante filtración por vacío, sobre papel filtro Whatman N° 1.

La selección para tolerancia a NaCl se llevó a cabo al subcultivar las suspensiones provenientes de los distintos tratamientos de NaCl a medio de cultivo fresco adicionado con 180 mM de NaCl. En este caso, también se incluyó una suspensión testigo cultivada en medio fresco libre de sal. Las cinco suspensiones se denominaron: 0/0, 0/180, 60/180, 120/180 y 180/180. Los subcultivos se mantuvieron en observación por siete semanas con muestreos iniciales a 7, 14 y 21 días. Una vez que éstos alcanzaron la fase estacionaria a los 49 días, se obtuvo su peso fresco final, así como el porcentaje de viabilidad celular.

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cinco repeticiones, quedando representada la unidad experimental por un matraz de 125 ml con 30 ml de suspensión celular. Se analizó la varianza de los datos y se compararon las medias de tratamientos con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Fig. 1 se aprecian las tendencias de crecimiento de las suspensiones celulares en los distintos tratamientos de sal. Los valores más altos de peso fresco de células se observaron a los 30 días para las suspensiones testigo y de 60 mM de NaCl, con 9784 y 9320 mg 30ml^{-1} , respectivamente. En cambio para las suspensiones tratadas con 120 y 180 mM de NaCl, el máximo peso fresco se presentó a los 36 y 30 días con valores de 5615 y 4493 mg 30ml^{-1} , respectivamente.

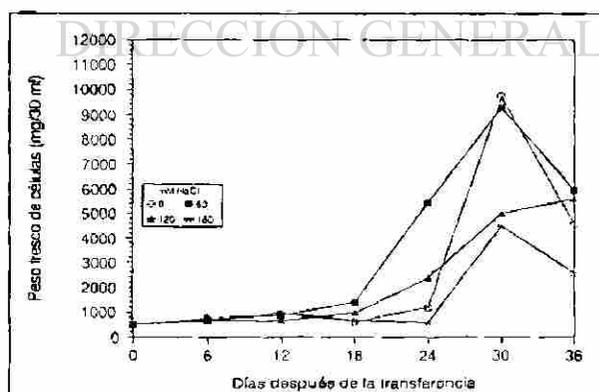


Fig. 1.- Crecimiento en peso fresco observado en suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl

En el ensayo en que las suspensiones celulares se subcultivaron en medio salinizado con 180 mM de NaCl, se detectaron diferencias significativas entre niveles de NaCl. Al considerar el peso fresco acumulado a los 49 días, en el Cuadro 1 se puede apreciar que la suspensión 60/180 presentó el valor más alto de peso fresco, con 4059 mg 30ml⁻¹, el cual fue diferente al testigo, con 1786 mg 30ml⁻¹. La diferencia fue de 2273 mg 30ml⁻¹, la cual fue estadísticamente significativa, así como la diferencia de 2183 mg 30ml⁻¹ de peso fresco obtenida al comparar la suspensión celular de 120/180 con el testigo a los 49 días después del subcultivo.

Los resultados presentaron tendencias similares a los encontrados por Croughan *et al.* (1), quienes observaron en líneas celulares de alfalfa y arroz seleccionadas por tolerancia a salinidad, pobre crecimiento en ausencia de sal y mejor crecimiento en presencia de ésta. Por su parte, Watad *et al.* (10) también encontraron en tabaco, que líneas adaptadas a la salinidad (NaCl) cultivadas gradualmente en medios menos salinos tuvieron mejor crecimiento y rendimiento que líneas originales no seleccionadas.

En observaciones realizadas al microscopio, fue notorio el predominio de células de forma esférica y tamaño relativamente pequeño para las suspensiones celulares cultivadas en medios con las mayores concentraciones de NaCl, en contraste con células de forma alargada y mayor tamaño en las suspensiones del testigo no tratadas con sal. Al respecto, Hasegawa *et al.*, (4) consideraron que la presencia de células de menor tamaño bajo condiciones salinas, puede representar una contribución para la tolerancia a la salinidad, ya que éstas podrían tener menor demanda de energía que las células de mayor tamaño.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Cuadro 1.- Peso fresco de células (mg 30 ml⁻¹) de *C. ulmaris* L. en una concentración de NaCl (180 mM), pretratadas previamente con NaCl en distintas concentraciones

Tratamiento NaCl (mM)	Días después del subcultivo				\bar{X}
	7	14	21	49	
0/0	730	679	1012	1786 b	1052.0 bc
0/180		811	348	739	1666 b
891.2 c					
60/180		574	613	1282	4059a
1632.4ab					
120/180	998	1052	1920	3924a	1973.6a
180/180	565	456	486	678 b	546.4 c
\bar{X}	736.0b	629.7b	1087.9b	2422.8a	1219.1

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05)

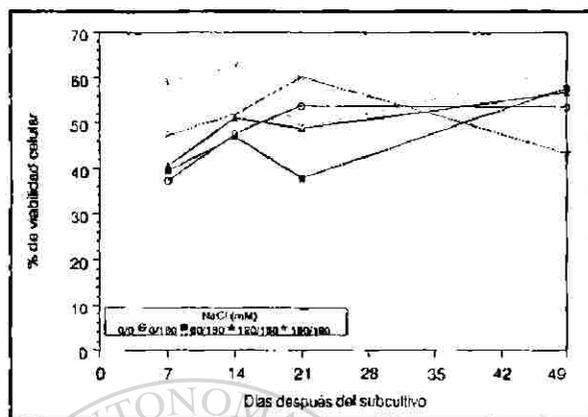


Fig. 2.— Comportamiento de la viabilidad observada de células de *C. ciliaris* L. en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl durante su crecimiento en suspensión.

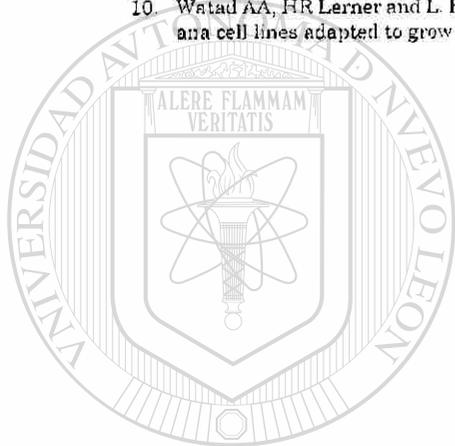
Tomando en consideración los patrones de crecimiento observados en los cultivos celulares sometidos a distintas concentraciones de NaCl, se deduce que (1), la accesión 240170 de zacate buffel no presentó sensibilidad al efecto de NaCl a una concentración de 60 mM y (2), que las suspensiones celulares cultivadas en medio con 60 y 120 mM en un primer ciclo de crecimiento, mostraron mejor comportamiento en crecimiento durante el subcultivo en una concentración de 180 mM de NaCl. Subcultivos obtenidos de éstas fueron considerados selecciones celulares para fines de mejoramiento genético.

Para la viabilidad celular, en la Fig. 2 se aprecia que en todos los tratamientos se presentó una tendencia inicial de incremento hasta los 14 días. Los tratamientos testigo, 60/180 y 120/180, presentaron una disminución a partir de esta fecha de muestreo hasta los 21 días. Posteriormente se incrementaron los valores a los 49 días, mientras que en los tratamientos 0/180 y 180/180 el incremento inicial de viabilidad se prolongó a 21 días, a partir del cual el primero permaneció sin cambio hasta el término del período considerado y el segundo tendió a disminuir. Esto explica en parte las diferencias del comportamiento en crecimiento de las suspensiones celulares ya mencionadas.

LITERATURA CITADA

1. Croughan TP, SJ Stavarek, DW Rains, *In vitro* development of salt resistant plants. *Environ Exp Bot* 21(1981) 317
2. Graham TWG, LR Humphreys, Salinity response of cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Aust J Exp Agr and Animal Husbandry* 10 (1970) 725
3. Gutiérrez P, LU López-D, A Durón-A, Tolerancia a la salinidad artificial del zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) durante su etapa de germinación. *Rev Manejo de Pastizales*, 4 (1991) 40

4. Hasegawa PM, RA Bressan, AK Honda, Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort Science* 21(1986) 1317
5. Ibarra FF, JR Cox, M Martín-R. Efecto del suelo y clima en el establecimiento y persistencia del zacate buffel en México y sur de Texas. Simposium Internacional sobre el Aprovechamiento Integral del Zacate Buffel, Soc Méx de Manejo de pastizales, A C Memorias Cd. Victoria, Tamps. México (1991) 14
6. Karadimova M, G Djambova, Increased NaCl-tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) through *in vitro* selection. *In vitro Cell Dev Biol* 29 (1993) 180
7. Larkin PJ, WR Scowcroft, Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60 (1981) 197
8. Murashige T, F Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (1962) 473
9. Saldivar FA, Ecosistemas del zacate buffel en Tamaulipas. Simposium Internacional sobre el Aprovechamiento de Zacate buffel. Soc Mex de Pastizales A C Memorias. Cd. Victoria, Tamps (1991) 42
10. Watad AA, HR Lerner and L. Reinhold, Stability of the salt-resistance character in Nicotiana cell lines adapted to grow in high NaCl concentrations. *Physiol Veg* 23 (1985) 887



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Inducción de organogénesis en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halepensis* (Mill)

(con 4 cuadros)

Cárdenas-Cerda Elizabeth¹, Carmen Ojeda-Zacarías²,
Manuel Rojas-Garcidueñas¹, Aurora Garza-Zúñiga¹,
Emilio Olivares-Sáenz¹, Esperanza Magallanes-Cedeño¹

Resumen. Se desarrolló un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* por medio de la organogénesis, utilizando cotiledones de semillas maduras como fuente de inóculo. Estos fueron colocados en dos medios de cultivo DCR y GD, suplementados con 0.3 mg l⁻¹ de BAP y 0.01 mg l⁻¹ de NAA; sacarosa, 30 g l⁻¹ para (DCR) y 20 g l⁻¹ para (GD); 5 g l⁻¹ de agar gel y pH 5.7. En estos medios permanecieron por 4 o 6 semanas a 26 °C ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. El arreglo de tratamientos fue un factorial 2³ con 6 repeticiones. La variable evaluada fue formación de callo y primordios de yemas. El tejido fue transferido a los medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento por 8 semanas; procediéndose a evaluar la variable número de cotiledones con brotes.

Los explantes fueron transferidos a los mismos medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1% de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por 8 semanas, evaluándose las variables número de brotes por cotiledón, número de brotes por embrión y longitud de brotes.

Los análisis de varianza muestran diferencia significativa para especie en todas las variables evaluadas con la excepción de longitud de brotes; mientras que para el factor medio de cultivo no existió significancia para las variables formación de callo y cotiledones que forman brotes por cotiledón y número de brotes por embrión. Las interacciones que resultaron significativas estadísticamente fueron especie-tiempo para todas las variables evaluadas con excepción de la variable brotes por cotiledón; en esta última, se observó diferencia significativa para la interacción medio-tiempo.

Abreviaturas: BAP= bencilaminopurina; NAA=ácido naftalenacético; IBA=ácido indolbutírico; DMS=Diferencia Mínima Significativa; DCR=(Gupta y Durzan, 1985); GD=(Gresshoff y Doy, 1972)

Palabras claves: Micropropagación, coníferas, organogénesis, explantes, medio de cultivo

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Carretera Zuazua-Marín Km 17.5, Marín, N.L., CP66700, E-mail macardenas@r.uanl.mx y ²Instituto Tecnológico de Nuevo León Eloy Cavazos N° 2001, Guadalupe, Nuevo León, C.P. 67170, E-mail: ojedacz@yahoo.com.mx

Recibido 13.XI.2002; aceptado 20.XII.2002

La importancia económica de los bosques de coníferas en México es muy grande; el género *Pinus* constituye la mayor parte de la riqueza forestal de México por su amplia distribución (11). El pino piñonero *P. cembroides* ocupa una amplia superficie en las zonas áridas y semiáridas de México (12) y es uno de los pocos recursos naturales de estas zonas pues sus semillas tienen valor en la industria de dulces y repostería. *P. halepensis* es importante por su adaptación a suelos pobres y resistencia a sequía (9) en la mayoría de las zonas a reforestar de México.

La propagación *in vitro* de las coníferas se ha desarrollado en los últimos años llevándose a cabo por diversos métodos (4); la respuesta de los explantes varía aun dentro de una misma especie según la tecnología de trabajo. Tanto citocininas como auxinas son necesarias para el cultivo *in vitro* de coníferas (1), pero Sen et al. (18) utilizando cotiledones de embriones maduros de *P. eldarica* encontraron que concentraciones superiores a 44 μM de BA eran perjudiciales para el desarrollo de brotes *in vitro*. También es importante el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento (4,15). Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Pinus cembroides* y de *Pinus halepensis* estudiando las variables: a) especie b) medio de cultivo y c) tiempo de exposición a fitoreguladores.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y desinfección de la semilla. Se obtuvieron semillas intactas de conos maduros de *Pinus cembroides* y *P. halepensis* se predesinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (6% ingrediente activo) y detergente sumergiendo las semillas durante 5 min.; luego fueron cepilladas y lavadas con agua. Se seleccionaron semillas de aprox. 1.5 cm en *P. cembroides* y aprox. 0.5 cm. en *P. halepensis* y se eliminaron las cubiertas.

Las semillas predesinfectadas se llevaron a una campana de flujo laminar colocándose en una solución de H_2O_2 de 12.5 vol. durante 45 min.; se enjuagaron con agua bidestilada y se transfirieron a etanol 70% por un min. A continuación se inmergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ing. activo) y agua al 15% v/v adicionado de 0.5cc de Tween-20 (poliexietileno sorbitan monovalente) durante 5 min. Finalmente se dieron 3 enjuagues por 5 min. con agua bidestilada esteril.

Medios de cultivo. Se utilizaron los medios DCR y GD (6,5). Se ajustó el pH a 5.7, se aforó a 1000 cc, se agregó agar gel 0.5% y se llevó a un horno de microondas durante 5 min. Se vació en frascos poniendo 25 cc / frasco y se esterilizaron a 121 °C y 1 atm de presión durante 15 min; ya esterilizados se añadió glutamina 50.0 mg/l a los frascos con medio DCR bajo una campana de flujo laminar.

Diseño del experimento. Se utilizó un diseño totalmente al azar y con arreglo factorial 2³ factor A: especies; factor B: medios de cultivo; factor C: tiempo de exposición a los fitorreguladores. Se tuvieron así 8 tratamientos con 6 repeticiones / tratamiento con un total de 48 unidades experimentales (1 embrión/ frasco) (Cuadro 1). Los valores obtenidos fueron transformados calculando la raíz cuadrada para los análisis de varianza y para asegurar una distribución normal (19).

Manipulación de los explantes. En general se siguió el protocolo de Patel & Thorpe (15). En los frascos había un número variable de cotiledones pero todos eran provenientes de un solo embrión; como éstos eran las unidades experimentales los análisis se hicieron por embrión.

Inducción de yemas. Se disectaron los cotiledones de embriones maduros y se sembraron en DCR o GD adicionado con BAP 0.3 mg l⁻¹ y con NAA 0.01 mg l⁻¹. Se incubaron con fotoperíodo de 16/8 h-luz a 2000 lux y 26 °C para la inducción de yemas. En cada frasco los cotiledones permanecieron de 4 o 6 semanas.

Alargamiento de yemas. Los cotiledones con primordios de yemas fueron transferidos a frascos con medio DCR o GD sin fitorreguladores permaneciendo en ellos durante 6 semanas. Al final de esta etapa se contó el número de yemas con, al menos, 2 primordios foliares bien desarrollados.

Formación de brotes. - Los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a frascos con medio DCR o GD sin fitorreguladores pero suplementados con 0.1% de carbón activado permaneciendo en ellos durante 8 semanas. Si bien algunos se necrosaron otros prosiguieron su desarrollo. Al final de esta etapa se evaluaron las variables siguientes:

a) número de cotiledones con brotes; b) número de brotes por embrión; c) número de brotes de 5 mm o mayores.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Factor A Especie	Factor B medio de cultivo	Factor C (semanas de exposición a fitorreguladores)	Número de tratamiento
<i>P. cembroides</i>	DCR	6	1
		4	2
	GD	6	3
		4	4
<i>P. halepensis</i>	DCR	6	5
		4	6
	GD	6	7
		4	8

Cuadro 1.- Tratamientos a los que se sometieron cotiledones de dos especies de *Pinus* para estudiar su respuesta *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cambios iniciales. Los cotiledones mostraron cambios desde la primera semana en el cultivo pasando de color crema inicial a color verde con pigmentación púrpura. A las 4 semanas se hizo evidente la formación de estructuras nodulares semejantes a callos así como primordios de yemas. El tiempo requerido para esta propuesta coincide con lo observado en otras especies de pino (15, 18)

Inducción de primordios de yemas. El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos respecto al número de cotiledones que mostraron callos o primordios de yemas. Existe DMS entre especies siendo mejor la respuesta en *P. cembroides* que en *P. halepensis*; también se tuvo DMS para el tiempo de exposición a BAP + NAA teniéndose mejores resultados con 4 semanas respecto a 6 semanas. La interacción entre ambos factores, especie y tiempo de exposición es significativa. En *P. cembroides* el número de cotiledones con callos y primordios de yemas disminuyó al incrementarse el tiempo de exposición, sin embargo *P. halepensis* la respuesta no fue afectada. Minocha (14) asienta que hay diferencias en la producción de callos y brotes entre las especies de pinos; esto puede deberse a factores propios de la especie o bien propios del establecimiento *in vitro* (2, 13, 17). La diferencia en brotación se debió al incrementar el tiempo de exposición a los fitorreguladores. Esto pudo deberse a una excesiva asimilación de BAP alcanzando niveles tóxicos; sin embargo Flinn et al (3) encontraron incrementos en la producción de callos al prolongar la exposición a BAP durante 8 semanas en *Pinus strobus*.

Número de brotes por embrión. En la evaluación del número de brotes se tomaron en cuenta solamente las yemas que se habían desarrollado y mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados. Las respuestas de los cotiledones a las condiciones *in vitro* son variables aunque provengan de un mismo embrión.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Especies		Exposición (semanas)	
<i>P. cembroides</i>	<i>P. halepensis</i>	4	6
5.06a	3.57b	5.19a	3.45a
Interacción especie-tiempo			
		Especies	Semanas
		4	6
<i>P. cembroides</i>		7.39a	3.16b
<i>P. halepensis</i>		3.38a	3.72a

Literales diferentes indican DMS.

Cuadro 2.- Número de cotiledones con callos y primordios de yemas en dos especies de *Pinus* sujetos a dos tiempos de exposición a BAP + NAA. Cifras promedio de repeticiones por tratamiento.

Los datos que siguen se refieren a la respuesta por embrión experimental. En la inducción y desarrollo de brotes *in vitro* *P. cembroides* respondió mejor que *P. halepensis* al protocolo de Patel y Thorpe (15).

Con respecto al tiempo de exposición en general el medio de cultivo DCR dio mejores resultados que el medio GD. Sin embargo al analizar la interacción especie-tiempo de exposición a los fitorreguladores se encontró que *P. cembroides* responde mejor con 4 semanas de exposición a BAP + NAA. En *P. halepensis* la mejor respuesta se tuvo con 6 semanas (Cuadro 3).

No es fácil definir la causa por la cual cotiledones provenientes de un mismo embrión difieren en el número de cotiledones con brotes y número de brotes por cotiledón. Jana y Tainter(8) afirmaron que un mismo protocolo sirve para cualquier tipo de pino. Sin embargo, Pérez-Bermúdez y Sommer (16) sugieren que la capacidad de regeneración se regula por los macronutrientes y que las vitaminas no son importantes al respecto; en *P. radiata* (14) los medios con alta relación NO_3/NH_4 favorecieron la caulogénesis. Se ha mostrado (4) que una larga exposición a BAP determina la formación de un menor número de yemas en diversas concentraciones del producto en *P. caribaeae*. Igualmente la exposición a

Especies		Medio de cultivo	
<i>P. cembroides</i>	<i>P. halepensis</i>	DCR	GD
10.24a	4.62b	10.11a	4.70b
Interacción especie-tiempo			
Semanas	<i>P. cembroides</i>	<i>P. halepensis</i>	
4	15.28a	3.24b	
6	6.25b	6.20a	

Cuadro 3.- Número de brotes por embrión en 2 especies de Pinos en 2 medios de cultivo y sujetos a 2 tiempos de exposición previa a BAP - NAA. Cifras promedio de 6 repeticiones/tratamiento.

Literales diferentes indican DMS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Repeticiones y tratamiento			
Medio de cultivo		Exposición (semanas)	
DCR	GD	4	6
8.12a	4.49b	7.39a	5.06b
Interacción especie-tiempo			
Semanas	<i>p. cembroides</i>	<i>p. halepensis</i>	
4	14.36a	2.72b	
6	4.75b	5.38a	

Cuadro 4.- Número de brotes de 5 mm o mayores en embriones de 2 especies de Pinos en 2 medios de cultivo y 2 tiempos de exposición previa a BAP + NAA. Cifras promedio de 6 repeticiones/tratamiento.

Literales diferentes indican DMS.

BAP por más de 28 días fue benéfica en la inducción pero puede perjudicar posteriormente, en el desarrollo de brotes (9).

Tamaño de los brotes. A las 8 semanas de la última transferencia a medios de cultivo sin fitorreguladores (después de 20 semanas de iniciado el cultivo *in vitro*) se midieron los brotes y se cuantificó y analizó el número de brotes de 5mm o mayores. El medio DCR mostró ser más favorable para el desarrollo de los brotes. La exposición a BAP + NAA durante 4 semanas favoreció al desarrollo de los brotes mas que la exposición durante 6 semanas. En la interacción especie-tiempo de exposición, al prolongarse el tiempo hubo efectos negativos en *P. Cembroides*; y positivos en *P. Halepensis*. Esto es importante ya que en organogénesis un aspecto determinante es la calidad de los brotes formados, siendo la longitud una de las características que más influye para su éxito posterior en el trasplante a suelo. Estudios recientes han mostrado que la supervivencia de las plántulas en el campo depende de su altura (17) (Cuadro 4) en ambos pinos.

El protocolo de cultivo de Patel y Trope (15) dio buenos resultados para la brotación de explantes provenientes de cotiledones tanto en *pinus cembroides* como en *pinus halepensis*.

En general el medio cultivo DCR fue más eficiente para inducir organogénesis que el medio GD en ambas especies.

En general *pinus cembroides* mostró mayor capacidad de respuesta en número y desarrollo de brotes.

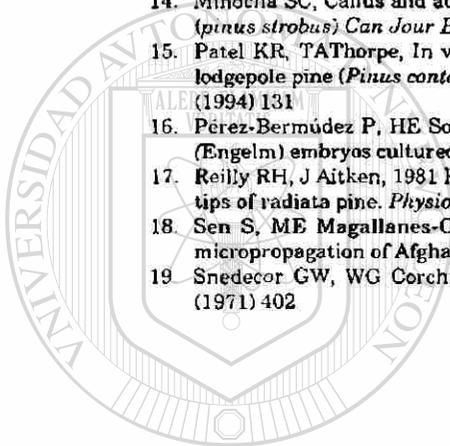
La respuesta de *P. cembroides* al tiempo de exposición BAP + NAA fue mejor con 4 semanas; en *P. halepensis* la respuesta mejor fue con 6 semanas.

El mayor número de brotes se tuvo en *pinus cembroides* expuesto 4 semanas a BAP + NAA y en medio de cultivo DCR.

LITERATURA CITADA

1. Atree SM, LC Fowke, Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers (ed) (En Y.P.S. Bajaj Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 17 (1991) 53 Springer) Berlin
2. Ellis DD, RC Judd, SDS PAGE analysis of bud-forming cotyledons of *pinus ponderosa*. *Plant cell, tissue and organ culture* 11 (1983) 57
3. Flinn BS, DT Wedd, W Georgis, *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*) *Can Jour Bot* 64 (1985) 1948
4. Go NE, GD Pérez-Orosco, SC Halos, *In vitro* response of embryos from different provenant of *pinus caribaea* var, hondurensis morelet. *Plant cell, tissue and organ culture* 32 (1993) 1
5. Gresshoff PM, CH Doy, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107 (1972) 161
6. Gupta PK, DJ Durzan, Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*pinus lambertiana*). *Plant cell Rept* 4 (1985) 177

7. Harry IS, TA Thorpe, Regeneration of plantlets through organogenesis from mature zygotic embryos of jack pine. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 37 (1994) 159
8. Jang JC, FH Tainter, Micropropagation of Shortleaf, Virginia and loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 25 (1991) 61
9. Lambardi M, KK Sharma, TA Thorpe, Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of alepo pine (*Pinus halepensis* Mill) *In vitro Cell Dev Biol* 29 (1993) 189
10. Lin x, Leung DWM, Culture of isolated Zygotic embryos of *Pinus radiata*. D. Don. Part I: factors influencing in vitro germination and growth of isolated embryos. *In vitro cellular and Developmental Biology -plant*, 38 (2002) 191(7)
11. Martínez M, Las pináceas Mexicanas. Sec Agric Ganad Subsec, Recursos Forestales y de Caza. México (1953) 362
12. Martínez M, Las Pináceas del Estado de México. Trabajo de la Comisión Botánica del Estado de México Dirección Agric y Ganad, Toluca, México (1953) 18
13. Martínez-Pulido C, IS Harry, TA Thorpe, Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29 (1992) 247
14. Minocha SC, Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*pinus strobus*) *Can Jour Bot* 58 (1980) 366
15. Patel KR, TAThorpe, In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta Dougl ex loud*) *Plants Cell, Tissue and Organ Culture* 3 (1994) 131
16. Pérez-Bermúdez P, HE Sommer, Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliottii* (Engelm) embryos cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11 (1987) 25
17. Reilly RH, J Aitken, 1981 Reliable plantlet formation from embryos and seedling shoot tips of radiata pine. *Physiol Plant* 53 (1981) 170
18. Sen S, ME Magallanes-Cedeño, RH Kamps, CR Mckinley, RJ Newton. In vitro micropropagation of Afghan pine. *Can Jour For Res* 24 (1994) 1248
19. Snedecor GW, WG Cochran, 1971. Métodos Estadísticos Ed. Continental, México (1971) 402



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BOTANIC GARDENS MICROPROPAGATION NEWS

Volume 1 Part 6

March 1993

ISSN 0962-7448

The sixth issue of the Botanic Gardens Micropropagation Newsletter is published by the Royal Botanic Gardens, Kew, in association with the Botanic Gardens Conservation Secretariat. I would like to thank the Friends of Kew for their very generous financial support and Kaisu Aapala, a Friend of Kew, for her help in the production of this issue.

Since the last issue, two conferences with relevant sections have been held - Etnobotánica 92 in Córdoba, Spain, and the 3rd International Botanic Gardens Conservation Congress in Rio de Janeiro, Brazil. Information on the publication of these papers will be given when known.

The International Association for Plant Tissue Culture are holding the VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture in Florence, Italy, June 12-17 1994. For details, contact: Organizing Committee and Secretariat, Viale G. Milton 81, 50129 Florence, Italy. Fax: +39.55.476393, Tel: +39.55.476377.

In the meantime, there is still some space available in Part 7 (December 1993) of the Newsletter, and articles are welcome for this or future issues.

Michael F. Fay

CONTENTS

Micropropagation of <i>Dyckia macedoi</i> - an endangered endemic Brazilian bromeliad H. Mercier & G. Kerbauy, Universidade de São Paulo, Brazil	70
Preliminary remarks on micropropagation of threatened <i>Limonium</i> species (Plumbaginaceae) M.D. Liedó <i>et al.</i> , Universitat de València, Spain	72
Micropropagation of <i>Astrophytum capricorne</i> , an endangered cactus from N.E. Mexico E. Cárdenas <i>et al.</i> , Universidad Autónoma de Nuevo León, México	75
Recent References	77



MICROPROPAGATION OF *ASTROPHYTUM CAPRICORNE* AN ENDANGERED CACTUS FROM N.E. MEXICO

Elizabeth Cárdenas¹, Ma. del Carmen Ojeda¹,
Teresa E. Torres² and Emilio Olivares Sáenz¹
Facultad de Agronomía¹ y Facultad de Ciencias
Biológicas²,
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Apdo Postal # 358, San Nicolás de los Garza,
N.L., México 64400

Abstract

Astrophytum capricorne was propagated *in vitro* by culturing explants from aseptically germinated seedlings. Cultures were initiated on Murashige and Skoog (MS) medium (1962) + 3.0 mg/l BAP, 1.0mg/l NAA, 100mg/l myo-inositol, 0.5% agar and 3% sucrose. Shoot proliferation was observed on MS with various growth regulators; 0.1 mg/l kinetin + 0.2 mg/l BAP gave best shoot proliferation from areoles.

Introduction

The cactus *Astrophytum capricorne* is included in the list of rare, threatened and endangered species of Mexico (Vovides, 1981).

Although habitat preservation will always be the most critical component in maintaining the greatest level of plant diversity, *in vitro* techniques can be used for propagation and preservation of tissues of particularly endangered plant species (Pence 1991).

The purpose of this work was to achieve *in vitro* shoot proliferation of *A. capricorne*.

Materials and Methods

The explants were sterile epicotyls excised from aseptically germinated seeds after two months growth. These were initially placed on Murashige and Skoog (1962) basal medium (MS) supplemented with 0.1 mg/l nicotinic acid, 0.1 mg/l pyridoxine.HCl, 1.0 mg/l thiamine.HCl, 2 mg/l glycine, 100 mg/l myo-inositol, 3.0 mg/l benzyl aminopurine (BAP), 1.0 mg/l naphthalene acetic acid (NAA), 30 mg/l sucrose and 5.0 g/l agar.

Explants with axillary buds were subcultured after

4 weeks onto the same medium but with varying growth regulators: 0.1mg/l kinetin + 0.2 mg/l BAP (2 CK'S) or 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (1 CK). Shoots were counted after 12 weeks.

Results and Discussion

Primary explants (epicotyls) showed callus formation and axillary bud growth after six weeks (Plate 1). Explants with axillary buds which were subcultured onto fresh 2 CK'S medium showed greatest shoot proliferation from areoles.



Plate 1. Callus and axillary bud growth after 6 weeks

2 CK'S and 1 CK gave mean shoot numbers of 29.5 and 8.75, respectively (Plates 2 & 3). This demonstrates that the response of the tissues depends predominantly on the growth regulators included in the medium (Fay and Gratton, 1992). These play an important role in micropropagation success causing and enhancing axillary shoot production (Clayton, 1987). Shoots were rooted on basal 1/2MS (Plate 4).

The results show that it is possible to achieve large scale clonal multiplication of this cactus from buds *in vitro* (Vyskot and Jara, 1984).



Plate 2. Shoot proliferation on 2 CK's medium

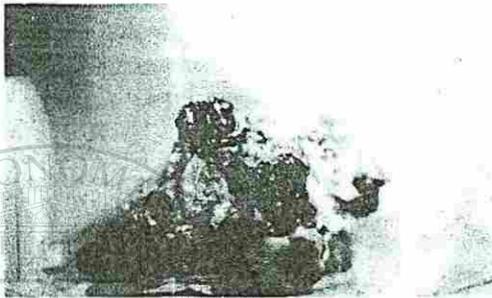


Plate 3. Shoot proliferation on 1CK medium

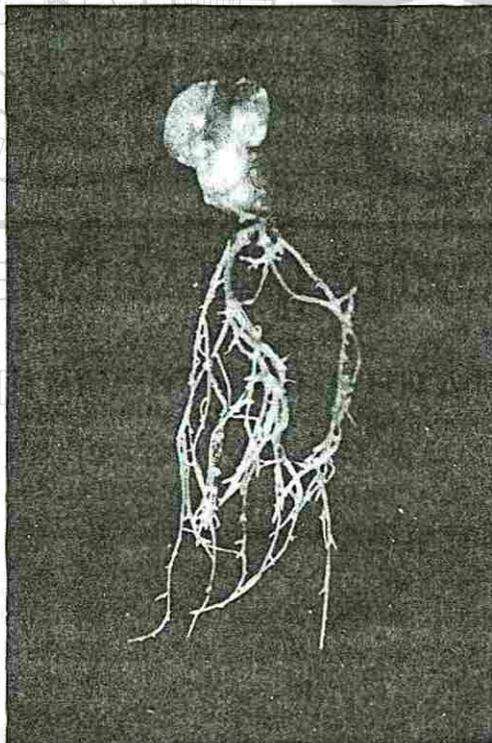


Plate 4. Rooting of *in vitro* propagated shoots

References

Clayton P.W. (1987) Micropropagation as a means of conservation and commercialisation of members of the subtribe Cactineae (Cactaceae). Unpublished thesis. New Mexico State Univ., Las Cruces, USA.

Fay M.F. and Gratton J. (1992) Tissue culture of cacti and other succulents - a literature review and a report of micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Pence V. (1991) Center for Reproduction of Endangered Wildlife. Plant Conservation Division. TCA Report 25(1):1-2.

Vovides A.P.(1981) Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biótica* 6(2):219-228.

Vyskot, B. and Z. Jara.(1984) Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 59:449-452.

PLANT CONSERVATION TECHNIQUES COURSE

25 October to 26 November 1993

This course, to be held at the Royal Botanic Gardens Kew, will review the options available to the plant conservationist by assessing the techniques from protected area management through to botanic gardens, seed banking and cryopreservation. The acquisition of skills coupled with the development of an applied approach to conservation biology will form the focus of the course.

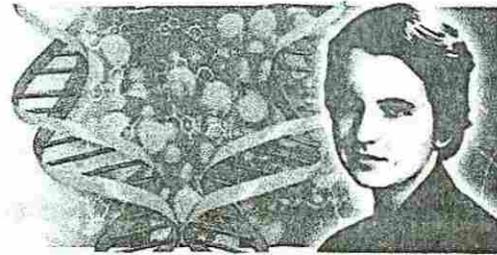
Further details from:

Education & Marketing Department
Royal Botanic Gardens, Kew
Richmond, Surrey
TW9 3AB, UK.

Fax: 081 332 5610 Tel: 081 332 5023/5026



III encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



Establecimiento *in vitro* del Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski).

Ojeda-Zacarías Ma. del Carmen^a, Hugo A. Luna-Olvera^b, Lilia H. Morales-Ramos^b, María J. Verde-Star^b, Teresa E. Torres-Cepeda^b, Benito Pereyra-Alfárez^b, Elizabeth Cárdenas-Cerda^c, Emilio Olivares-Sáenz^c y Raúl Salazar-Sáenz^c

^a Instituto Tecnológico de Nuevo León, Eloy Cavazos N° 2001, Guadalupe, Nuevo León. CP. 67170, e-mail ojedacz@yahoo.com.mx

^b Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Apdo. Postal 38F, Pedro de Alba, s/n, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, N.L. México, CP. 66450.

^c Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Carretera Zuazua -Marín Km 17.5, Marín, N.L., CP. 66700.

RESUMEN

México cuenta con una gran cantidad de especies endémicas, entre las cuales se encuentra *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) ya que está catalogada como una especie en peligro de extinción, confinada a una población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en una superficie de 400 ha. En estos casos, es necesario establecer técnicas de propagación que permitan incrementar la disponibilidad del material vegetativo. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Pinus maximartinezii* por medio de organogénesis. Embriones cigóticos y cotiledones obtenidos de semillas maduras fueron colocados en los medios de cultivo DCR y GD adicionados con 0.3 mg l⁻¹ y 0.5 mg l⁻¹ de BAP; 0.01 mg l⁻¹ de NAA, permaneciendo por 6 semanas en condiciones de 26°C ± 2°C y un fotoperíodo de 16 h. luz y 8 h. oscuridad. Posteriormente los explantes fueron transferidos a los medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento a intervalos de 15 días, durante 6 semanas, la variable evaluada fue número de explantes con yemas. Por último los explantes fueron transferidos a los mismos medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1% de carbón activado, permaneciendo por 8 semanas; evaluándose el número de brotes por embrión. Los análisis de varianza mostraron diferencia significativa en medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia económica de los bosques de coníferas en México es muy grande; el género *Pinus* constituye la mayor parte de la riqueza forestal por su amplio rango de distribución (5). El piñón azul o maxi piñón (*Pinus maximartinezii* (Rzedowski), ha sobrevivido a una restricción genética extrema ya que está confinado a una sola población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en el sur del estado de Zacatecas, México y se encuentra en la lista de las especies en peligro de extinción (4 y 9).

En estos casos la propagación *in vitro* ha demostrado ser un método exitoso para la conservación y mantenimiento de especies en peligro de extinción (7). Sin embargo, se han observado diferentes respuestas con la utilización de medios de cultivo y reguladores de crecimiento Ojeda (10). Por lo que, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada una de las especies (1 y 12). Diversos investigadores, utilizando cotiledones de embriones maduros encontraron que concentraciones distintas de benciladenina favorecen el desarrollo de brotes *in vitro*. (1,11). Así mismo, Niella y Rocha (8) utilizando cotiledones

provistos de hipó cotilos obtuvieron una mayor respuesta con la utilización de BA. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Pinus maximartinezii*, estudiando la variable número de brotes por explante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de la semilla.- Se obtuvieron semillas intactas de conos maduros de *Pinus maximartinezii*. Para su desinfección se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ingrediente activo) y detergente durante 5 in.; estas fueron cepilladas y lavadas con agua. Se seleccionaron semillas de aprox. 2.5 cm. y se eliminaron las cubiertas. Posteriormente las semillas seleccionadas se llevaron a una campana de flujo laminar colocándose en una solución de H₂O₂ de 12.5 vol. durante 45 min.; se enjuagaron con agua bidestilada esterilizada y se transfirieron a etanol 70% por un minuto; a continuación se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% ing. activo) adicionado de 0.5cc de Tween-20 (poliexietileno sorbitan monovalente) durante 5 min. Finalmente se enjuagaron por 5 min. con agua bidestilada esterilizada. Se utilizaron los medios de cultivo DCR y GD (2,3). Adicionados con 0.3mg^l⁻¹ y 0.5mg^l⁻¹ de BAP; 0.01mg^l⁻¹ de NAA; Sacarosa 30g^l⁻¹ para DCR y 20g^l⁻¹ para GD; 5g^l⁻¹ de agar gel y ajustándose el pH a 5.7 ± 0.1. Se esterilizaron a 121°C y 1 atm. de presión durante 15 min. En este caso fueron evaluados ocho tratamientos con ocho repeticiones.

Diseño del experimento.- Se utilizó un diseño totalmente al azar y con arreglo factorial 2³ factor A: explantes; factor B: medios de cultivo; factor C: concentración a los reguladores de crecimiento donde la variable dependiente a evaluar fue numero de brotes por embrión.

Inducción de yemas.- Cotiledones de embriones maduros y embriones cigóticos completos fueron colocados en los tratamientos señalados, incubándose durante seis semanas por 16/8 h-luz, a 2000 lux y 26°C ± 2°C para la inducción de yemas.

Alargamiento de yemas.- Los cotiledones y embriones fueron transferidos a frascos con medio DCR ó GD sin reguladores de crecimiento y disminuyendo la sacarosa a la mitad de su concentración, en estas condiciones permanecieron por seis semanas. Al final de esta etapa se evaluó el número de yemas que presentaban al menos 2 primordios foliares bien desarrollados.

Formación de brotes.- Los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a los mismos medios de cultivo pero adicionados con 0.1% de carbón activado manteniéndose estos durante 8 semanas. Para esta etapa se evaluó la variable número de brotes por embrión.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de yemas.- Desde las primeras semanas de iniciado el cultivo los cotiledones y embriones presentaron la formación de estructuras nodulares semejantes a callos, al transcurrir seis semanas en el medio.

Alargamiento de yemas.- Se hicieron evidentes primordios de yemas después de seis semanas en los medios de cultivo. Sin embargo no se presentaron diferencias significativas para ninguno factor, los resultados se muestran en el cuadro 1. El tiempo requerido para esta respuesta coincide con lo observado en otras especies de pino (10 y 11).

Cuadro 1. Promedios obtenidos a las seis semanas en la etapa de alargamiento de yemas evaluándose el número de primordios de yemas en *Pinus maximartinezii*.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg ^l ⁻¹	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
1.093a	1.375a	1.312a	1.156a	1.281a	1.187a

Formación de brotes.- Para la evaluación del número de brotes se tomaron en cuenta solamente las yemas que mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados.

Cuadro 2. Número de brotes promedio de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas en la etapa de formación de brotes.

Medio de cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg ^l ⁻¹	
DCR	GD	0.3	0.5
4.031a	2.844b	2.969a	3.906b

Literales diferentes indican DMS.

En general el medio de cultivo DCR mostró mejores resultados que el medio GD. Así mismo, al analizar la concentración de los reguladores de crecimiento se encontró mayor respuesta con 0.5mg^l⁻¹ BAP en comparación con 0.3mg^l⁻¹ (cuadro 2). No es fácil definir la causa por la cual cotiledones provenientes de un mismo embrión presentan diferencias en su respuesta, es necesario ajustar el protocolo de regeneración para cada especie de pinos. Ya que algunas especies responden exitosamente a dosis bajas de BA y otras responden mejor a dosis mayores de citocininas. (12) la respuesta observada del presente trabajo coincide con lo reportado por Niella y Rocha (8). Quienes utilizando cotiledones provistos de hipó cotilos obtuvieron una mejor respuesta con altas concentraciones de BA. Así mismo Ojeda (10) encontraron en *Pinus halepensis* que conforme se incrementa la concentración de BA, la respuesta de los explantes fue mayor. Por lo que, la mayoría de las regeneraciones *in vitro* del genero *pinus* a sido el resultado de la utilización de embriones maduros así como de la concentración de los reguladores de crecimiento (6,11) En general la mayor respuesta se obtuvo a partir de embriones cigóticos completos en el medio DCR utilizando 0.5mg^l⁻¹ de BAP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Go, N.E; G.D. Pérez-Orosco y S.C, Halos 1993. In vitro response of embryos from different provenants of *pinus caribaea* var, hondurensis morelet. Plant cell, tissue and organ culture 32: 1-7.
2. Gresshoff, P.M. y C.H. Doy 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Planta 107: 161-170.
3. Gupta P.K. y D.J. Durzan 1985 Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*pinus lambertiana*). Plant cell Rep. 4:177-179.
4. Ledig, F. T, T. M. Conkle, Bermejo-Velazquez, T. Eguiluz-Piedra, P.D. Hodgskiss, D.R. Johnson y W. S. Dvorak.1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rara mexican oinyon: Genetic diversity disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii* evolution 53 (1): 191-199.
5. Martínez, M. 1953* Las pináceas Mexicanas. Sec. Agric. Ganad. Subsec. Recursos Forestales y de Caza. México p.362.
6. Martínez-Pulido C.; I.S. Harry y T.A. Thorpe 1992 Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:247-255.
7. Mata M.R.,V y M. Chávez y R. B. Boettler,. 2001. In Vitro regeneration of plantlets from in mature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. In vitro cellular y Developmental biology; Columbia. 1 (37):73-79.
8. Niella, F. y P. Rocha. 2001. Research and Development of vegetative Propagation Techniques for *Pinus* sp. In the Northeast Region of Argentina. Proceedings of the 26 Th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001. Ed: Jeffrey F.D. Dean-Georgia University, Athens, GA USA. Pp. 32-38.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-94, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial (16 de mayo de1994); 1994: 2-25.
10. Ojeda, M. 1992. inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Pinus cembraoides* y *Pinus halepensis*. Tesis de maestría, FA-UANL. Mty. México. 44-47.
11. Patel, K.R. y T.A.Thorpe 1994. In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl ex loud) Plants Cell, Tissue and Organ Culture 3:131-142.
12. Saravitz, C.H. 1990. In vitro propagation of Fraser fir (*Abies fraseri*) and Virginia pine (*Pinus virginiana*) from embryonic explants. Ph.D Dissertation. North Carolina State University. 108 pp.

PROPAGACION *in vitro* DE *Astrophytum capricorne* (Dietrich)

Elizabeth Cárdenas C.,¹ Ma. del Carmen Ojeda Z.,² Emilio Olivares S.¹ y Teresa E. Torres C.³

Resumen

Se obtuvo la propagación *in vitro* de *Astrophytum capricorne* utilizando plántulas germinadas asépticamente. La etapa de inducción se produjo en el medio Murashige-Skoog (MS) adicionado con 5.0 g.l⁻¹ de agargel, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, la solución modificada de vitaminas de White, 3.0 mg.l⁻¹ BAP y 1.0 mg.l⁻¹ NAA. Posteriormente, la máxima proliferación de brotes se observó en el medio básico MS, variando el contenido de reguladores de crecimiento, siendo 0.1 y 0.2 mg.l⁻¹ de Cinetina y BAP respectivamente.

Cienc. Agropecu. FAUANL. 1992. 5(2) 3-6

Summary

In vitro propagation of *Astrophytum capricorne* was achieved by culturing explants from seedlings aseptically germinated. Induction stage was obtained by culture on Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with 5.0 g.l⁻¹ agargel, 30 g.l⁻¹ sucrose, White's modified vitamin solution, 3.0 mg.l⁻¹ BAP and 1.0 mg.l⁻¹ NAA. Maximum shoot proliferation was observed in MS mineral salts, varying plant regulators content, being 0.1 and 0.2 of Kinetin and BAP respectively.

Introducción

Astrophytum capricorne es una cactácea incluida en la lista de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción.

Aunque la conservación del hábitat será siempre lo más crítico para el mantenimiento del máximo nivel de diversidad vegetal, las técnicas *in vitro* pueden proveer métodos alternativos para la propagación y la conservación de especies vegetales amenazadas. (Pence, 1991).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el medio del cultivo óptimo para obtener *in vitro* proliferación de brotes de *A. capricorne*, considerando que el número de brotes es la variable más importante en micropropagación, ya sea para fines de multiplicación o conservación de la especie.

Revisión de Literatura

El cultivo de tejidos vegetales ha sido reconocido como una herramienta muy útil en la horticultura desde hace más de 30 años; actualmente es el principal método de propagación en algunos países para una amplia gama de especies, entre las cuales se encuentran las orquídeas y plantas de interior (Evans, 1990).

Entre las familias de plantas suculentas, las cactáceas han recibido gran atención con respecto al cultivo *in vitro*. Esta técnica se ha convertido en una gran estrategia para propósitos de conservación de este recurso que tiene México, puesto que en últimas fechas debido a un continuo saqueo de las especies endémicas y aunado a la drástica destrucción del hábitat, la mayoría de las cactáceas de este país se encuentran en inminente peligro de extinción (Vovides, 1981; Sánchez, 1990).

La micropropagación también es utilizada para contrarrestar las dificultades que se presentan en la propagación tradicional de plantas raras o amenazadas (Simerda, 1990). Por ejemplo, Ault y Blackmon (1985) trabajando en la propagación de cactus nativos, encontraron que la adición de ácido naftalenacético (NAA) y cinetina al medio provocó la proliferación de brotes axilares en *Echinocereus* y *Ferocactus*. Esto demuestra que la respuesta de los tejidos a un medio depende principalmente de los reguladores de crecimiento incluidos (Fay y Gratton, 1992), los cuales juegan un papel muy importante en el éxito de la micropropagación al favorecer la producción de brotes axilares según la especie (Clayton, 1987; Evans, 1990). Este fenómeno también fue observado por Vyskot y Jara (1984) quienes obtuvieron la producción de brotes en *Mammillaria carmenae* y *M. prolifera* a partir de las porciones que presentaban areolas; y atribuyen esta proliferación al hecho de que con la adición de citocininas los meristemas en reposo, reanudaron su crecimiento.

Trabajo realizado con fondos del CONACYT, como parte del Proyecto "Micropropagación de cactáceas vulnerables del Estado de Nuevo León"

¹ Maestros del Departamento de Fitotecnia de la PAUANL. Carretera Zuazua-Marín km 17.5 Marín, N.L. Apartado Postal 358. San Nicolás de los Garza, N.L. México. C.P. 66450

² Tesista del Departamento de Fitotecnia de la FAUANL.

³ Maestra de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Apartado Postal F-16 Ciudad Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L. México. C.P. 66450

En general el uso ventajoso de esta técnica radica en la producción de altos volúmenes de plantas, con un mínimo material, al grado de considerarse que en algunas cactáceas como *Leuchtenbergia principis*, es posible producir en dos años más de 300,000 brotes a partir de una plántula (Starling, 1985).

Materiales y Métodos

Para la obtención del inóculo se utilizaron plántulas de *A. capricorne* germinadas en condiciones asépticas, a partir de las cuales fue seleccionado el epicotilo.

Con el propósito de obtener incremento del inóculo inicial, los epicotilos fueron sembrados en el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS, 1962) adicionado con los constituyentes utilizados por Cárdenas et al. (1991 a, b), donde la concentración de reguladores de crecimiento fue de 3.0 y 10 mg.l⁻¹ de bencil aminopurina (BAP) y NAA respectivamente. A este medio se le denominó medio de inducción con el fin de diferenciarlo de los medios de proliferación utilizados posteriormente.

Una vez obtenido el incremento, y con el propósito de obtener la etapa de proliferación de brotes, el crecimiento producido se subcultivó a las cuatro semanas en el medio de cultivo MS, variando principalmente el contenido de reguladores de crecimiento.

Los tratamientos consistieron en variar diversos constituyentes en donde por presentar una citocinina (BAP), o dos citocininas (BAP y cinetina) a los medios de cultivo se les denominó medio 1 CK y 2 CK respectivamente.

Los medios 1 CK y 2 K incluyen además del medio básico, en mg.l⁻¹:

	Tratamiento	
	1 CK	2 CK
Cinetina		0.1
BAP	5.0	0.2
NAA	0.1	-
NaH ₂ PO ₄	170.0	-
Tiamina	0.4	1.0
Sacarosa	30,000.0	30,000.0
Agar-gel	5,000.0	5,000.0

El inóculo consistió en sembrar en ambos medios, 1.5 cm del crecimiento previamente obtenido en el medio de inducción. Cada tratamiento consistió de ocho repeticiones, las cuales fueron distribuidas en un arreglo completamente al azar en una cámara bioclimática a 27°C con un fotoperíodo de 16 h a una intensidad lumínica de 2,000 lux; en estas condiciones los cultivos permanecieron 12 semanas, transcurridas éstas, se evaluó el número de brotes por unidad experimental.

Resultados y Discusión

El número de brotes obtenidos en ambos medios se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Número de brotes obtenidos a partir de los medios de proliferación a las 12 semanas de la siembra.

Repeticiones	Medio 1 CK	Medio 2 CK
1	13	59
2	12	4
3	2	6
4	5	5
5	8	47
6	8	49
7	11	52
8	11	14

Con los datos obtenidos se procedió a realizar el análisis de varianza correspondiente, resultando en una diferencia significativa; por lo anterior, se efectuó la comparación de medias utilizando el método de la diferencia mínima significativa (DMS) con el cual se corroboró una mayor eficiencia del medio 2 CK para la diferenciación de brotes (Figura 1).

La diferencia en la respuesta puede atribuirse a que el medio 1 CK posee una combinación de auxina y citocinina, mientras que el medio 2 CK incluye dos citocininas y, normalmente, en la micropropagación éstas se utilizan para romper el reposo de las yemas laterales (Fay y Gratton, 1991). En cactáceas, particularmente, se considera que el área meristemática está incluida en el área de las areolas (Gratton y Fay, 1991); por lo que es posible que nuevos

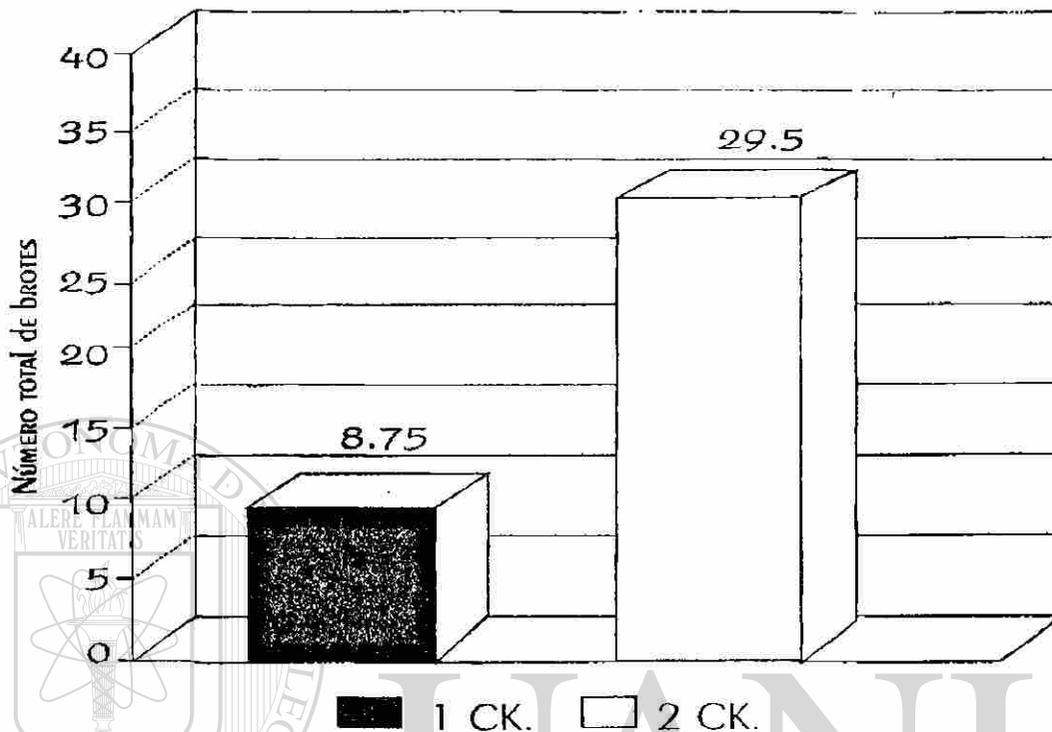


Figura 1. Número de brotes promedio de *Astrophytum capricorne* obtenidos a partir de los medios de proliferación a las 12 semanas de la siembra.

brotes empiecen a crecer directamente de éstas a partir de los meristemos en reposo (Vyskot y Jara, 1984). Por lo anterior, es evidente que la diferencia en el número de brotes es debida a la presencia de ambas citocininas.

Los resultados claramente muestran las ventajas de la micropropagación, en donde el número de brotes es la variable más importante, así que el desarrollo de tales métodos de propagación puede ayudar grandemente a la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción.

Conclusiones

1. La combinación y proporción de los reguladores de

crecimiento es fundamental en las diversas fases de la micropropagación de *A. capricorne*.

2. El medio de cultivo adicionado con bencil aminopurina y cinetina resultó ser más eficiente para la etapa de proliferación de brotes de *Astrophytum capricorne*.

Bibliografía

- Ault, J.R. y W.J. Blackmon. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species. Hort. Sci, 20(3):541.
- Cárdenas, E., O. González y T. Torres. 1991. *In vitro* maintenance of *Echinocactus platyacanthus*. *In vitro* Cell & Develop. Biol, 27(3) 106-A.

- Cárdenas, E., O.L. González, E. Olivares y T.E. Torres. 1991. Efecto de diversos niveles de reguladores de crecimiento en el mantenimiento del cultivo de callo de la biznaga verde (*Echinocactus platyacanthus*). *Ciencia Agrop.* 4(1) 11-14.
- Clayton, W.P. 1987. Micropropagation as a means of conservation and commercialization of members of the subtribe Cactinae (Cactaceae). Unpublished thesis Master degree. New Mexico State University.
- Evans, N.E. 1990. Micropropagation Axillary Bud Multiplication. En: J.W. Pollard y J.M. Walker (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. pp. 93-103.
- Fay, M.F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents - a literature review and a report of micropropagation at Kew. En Prensa.
- Gratton, J. y M.F. Fay. 1991. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. En: J.W. Pollard y J.M. Walker (Ed.) *Methods in Molecular Biology*. Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. pp. 219-225.
- Johnson, J.L. y E.R. Emino. 1979. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *Hort. Sci.* 14(5) 605-606.
- Mauseth, J.D. 1977. Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cact. & Succ. J. (US)* 59: 80-81.
- Pence, V. 1991. Center for reproduction of endangered wildlife. TCA Report 25(1) 1-2.
- Sánchez, E. 1990. El Japón y las cactáceas. *Tella-ni* 51: 5-7.
- Simerda, B. 1990. Effective ways of propagating endangered cacti. *British Cactus and Succulent Journal*. 8: 9-12.
- Starling, R. 1985. *In vitro* Propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. & Succ. J. (US)*. 57:114-115.
- Vovides, A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biótica* 6(2): 219-228.
- Vyskot, B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary bud *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59: 449-452



por Niella y Rocha (2001). quienes observaron cambios iniciales en ambos explantes desde los 10 a 15 días de la inducción, presentando color verde rojizo; concluyendo que tanto los cotiledones como los embriones cigóticos maduros, poseen capacidad morfogénica que permite el desarrollo posterior en las siguientes etapas.

A las 6 semanas del cultivo, se formaron estructuras nodulares similares a callos con primordios de yemas presentes, así mismo, se observaron cambios cualitativos en la morfología de los explantes. Esto es similar a lo reportado por Pérez- Bermúdez y Sommer (1987), quienes observaron que los embriones de *Pinus elliotii* sobre medio sólido conteniendo citocinina, respondieron a partir de la primera semana y la proliferación celular se inició a partir de cotiledones y algunas veces del hipocotilo que estaba en contacto con el medio de cultivo. Posteriormente, a las 5 semanas observaron el desarrollo de yemas a partir de embriones.

Con respecto a lo anterior, investigaciones previas en pinos han indicado que los niveles de citocininas usados para la formación de estructuras adventicias, pueden promover altos niveles de ADN nucleico (Patel y Berlyn, 1982; Renfoe y Berlyn, 1985; Hargreaves *et al.*, 2005); se han observado cambios metabólicos provocados por la adición de BA en explantes de *Pinus* (Winkler, 1995; Moncalean, *et al.*, 2006 y Stasolla, *et al.*, 2007) en general, las citocininas promueven la formación *in vitro* de centros meristemáticos que llevan a la diferenciación posterior de yemas y brote (Hiriart 1991; Hargreaves *et al* 2004); razón por la cual, en esta etapa, el 100 % de los explantes presentaron respuesta, no detectándose diferencia significativa.

7.3 Alargamiento de yemas

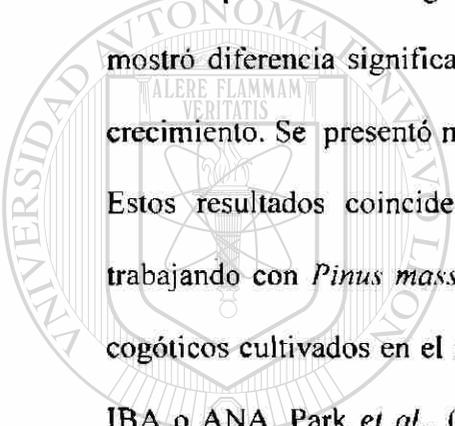
Una vez concluida la etapa de inducción de yemas, es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Harry y Thorpe, 1994). Es indispensable la transferencia subsecuente de las yemas a medios de cultivo con concentraciones bajas de reguladores de crecimiento para la formación de brotes de alta calidad (Zhang *et al.*, 2006). Generalmente las yemas adventicias formadas son separadas del explante original y el crecimiento de brotes aislados puede ser estimulado por la dilución del medio básico; adición de carbón activado y en ocasiones disminución de sacarosa; (Sen *et al.*, 1994; Capuana, 2001; Zhang, *et al.*, 2006).

Con respecto a la anterior técnica, en el presente estudio, el número de yemas que presentaban 2 primordios foliares, no presentó diferencia significativa para medio de cultivo, concentración o explante. Sin embargo, la respuesta morfogénica de los explantes en los tratamientos utilizados y el tiempo requerido, coincide con lo observado con los resultados observados por Mata *et al.*, (2001), quienes trabajando con *Pinus chihuahuana* (conífera endémica y en peligro de extinción), encontraron que no todos los explantes iniciales de cada tratamiento originaron yemas adventicias.

7.4 Formación de brotes

La organogénesis directa es la técnica de proliferación de brotes adventicios, más utilizada en sistemas de micropropagación. El medio de cultivo y las condiciones de crecimiento son optimizados para lograr las máximas tasas de multiplicación (Phillips *et al.*, 1995).

En la presente investigación, con respecto al número de brotes, el análisis de varianza mostró diferencia significativa en medio de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento. Se presentó mayor respuesta en el medio DCR en comparación con el GD. Estos resultados coinciden con lo consignado por Zhang *et al.*, (2006), quienes trabajando con *Pinus massoniana* observaron mejores resultados a partir de embriones cogóticos cultivados en el medio DCR adicionado con 0.5 mg^l⁻¹ de BA y 0.05 mg^l⁻¹ de IBA o ANA. Park *et al.*, (2006), afirman que diversas especies responden diferente al

tipo de regulador de crecimiento, concentración, medio de cultivo y sus combinaciones; por lo que se deben desarrollar protocolos para cada especie en particular (Thorpe, 2004;  UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN [®]

Hargreaves *et al.*, 2005). Sin embargo, el número de brotes y la capacidad de formación de brotes han sido considerados como los mejores parámetros para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en la micropropagación (Burkhart, 1991; Arrillaga *et al* 2005).

En relación a lo anterior, se presentó mayor número de brotes (3.90) cuando se utilizó el BAP a razón de 0.5 mg^l⁻¹, comparado con 0.3mg^l⁻¹ que fue únicamente de (2.96).

La respuesta observada en ésta etapa, coincide con Hargreaves *et al.*, (2004) quienes encontraron que el número promedio de brotes por explante varió entre 3.6 a 5.5 en *Pinus radiata*, utilizando BA en el medio de cultivo por 8 semanas. Al respecto, Lambardi *et al.*, (1993) y Zhang, *et al.*, (2006), determinaron que la frecuencia de brotes se incrementó conforme al incremento de las concentraciones. Sin embargo, concentraciones superiores a 40 micromolar, perjudicaron la formación de brotes (Sen *et al.*, 1994). Por lo tanto, la optimización de los protocolos de micropropagación, deben realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo.

7.5 Longitud de brotes

La longitud de brotes es una de las características que mas influyen para el éxito posterior en la etapa de transplante a suelo.

Después de 8 semanas en condiciones de cultivo *in vitro*, no se presentó diferencia significativa para esta variable. La tendencia en general, fue similar a lo mencionado por (Halos y Go, 1993; Patel y Thorpe, 1994 y Zhang, *et al.*, 2006), quienes demostraron que el alargamiento de brotes fue inhibido por altas concentraciones de BA.

7.6 Capacidad de formación de brotes

La evaluación de éste índice permite mediciones cuantitativas objetivas que pueden ser utilizadas para seleccionar los mejores tratamientos (Lambardi, 1993).

Al efectuar el análisis, se presentó diferencia significativa en cuanto al tipo de explante. La mayor respuesta se observó con embrión cigótico en el medio DCR adicionado con 0.5 mg l^{-1} de BAP. Lo anterior es consistente con lo reportado por Hargreaves *et al.*, (2005) quienes evaluaron la tasa de multiplicación de brotes dividiendo el número total de explantes subcultivados por el número total de explantes; después de 4 ciclos de transferencia, los cultivos provenientes de embriones mostraron mayor tasa de multiplicación; atribuyéndolo a la presencia de mayor tejido meristemático, en comparación con los cotiledones.

7.7 Enraizamiento de brotes *in vitro*.

Aunque la producción de yemas adventicias *in vitro* en coníferas ha sido exitosa, con frecuencia existe dificultad en el enraizamiento Capuana (2001), logró la multiplicación de brotes de *Pinus cembra* y *Pinus pinea*, sin embargo, el enraizamiento fue difícil de obtener.

En el primer experimento establecido para la etapa de enraizamiento, todos los brotes presentaron oxidación. Estos resultados coinciden con Oliveira *et al.*, (2003), quienes utilizando tratamientos de pulso, no tuvieron éxito en el desarrollo de raíces.

En el segundo experimento, los brotes solo respondieron formando callo en la parte basal; lo anterior puede ser atribuido al efecto de los hongos micorrízicos y que el balance de los reguladores de crecimiento favoreció la multiplicación celular, inhibiendo la diferenciación de raíces (Pierik,1990). Así mismo, coincide con lo señalado por Arrillaga *et al.*, (2005) quienes utilizando tratamientos de auxinas e inoculación con microorganismos no tuvieron éxito en la inducción de raíces.

En el tercer experimento, con la finalidad de presentar una respuesta cuantitativa de la variable en estudio, se procedió a utilizar una prueba no paramétrica de tablas de contingencia, presentándose diferencia significativa en cuanto al tiempo de pulso. Encontrando en promedio 8 brotes con una raíz y 3 con dos raíces. Esta prueba mostró que el enraizamiento es independiente de los medios de cultivo.

En general, se obtuvo 26.56 % de brotes con raíces, después de 28 semanas de cultivo *in vitro*. Lo anterior es consistente con González *et al.*, (1998), quienes obtuvieron solo 15 % de formación de raíces después de 5 meses de cultivo trabajando con *Pinus pinea*. Por su parte, Saravitz (1990), con *Pinus virginiana* utilizó 40 mg l⁻¹ de IBA en el medio de cultivo logrando obtener 3% de brotes con raíz.

Sin embargo, se han obtenido porcentajes de enraizamiento mas altos en diversas coníferas; por ejemplo, Chin Yi *et al.*, (1991), obtuvieron entre 25 al 80% en *Picea rubens*. Así mismo, Liao (1993), logró el enraizamiento en *Pinus elliottii* (Engelm) con 125 µM de IBA, alcanzando 89% de brotes con raíz; Hargreaves *et al.*, (2004), observaron valores entre 65 y 73 % de enraizamiento en *Pinus radiata*. Lo anterior

corroborar lo expresado por diversos autores, quienes trabajando con especies de *Pinus*, consideran que a pesar de la naturaleza empírica del protocolo de micropropagación, los requerimientos para cada etapa, deben ser determinados experimentalmente (Lambardi *et al.*, 1993; Thorpe 2004; Hargreaves *et al.*, 2006).

7.8 Enraizamiento de brotes *in vivo*

De acuerdo a los resultados obtenidos en los tratamientos, se puede mencionar que la especie tiene capacidad para ser enraizada *in vivo*. Existen evidencias en otras investigaciones donde el co-cultivo *in vivo* de los brotes, con hongos ectomicorrízicos puede ser efectivo para contrarrestar las dificultades de enraizamiento en pinos Oliveira *et al.*, (2003). Además la inoculación puede incrementar la habilidad de las plántulas para contrarrestar el estrés producido por la transferencia *ex vitro*. Ciertos factores pueden actuar de manera sinérgica en los genotipos que sean compatibles con hongos

(Niemi *et al.*, 2004)

7.9 Aclimatación de plantas

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las plantas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia (Villalobos *et al.*, 1983).

Durante el proceso de aclimatación de plantas en general, los brotes mostraron respuesta favorable. El bajo porcentaje de plántulas aclimatadas puede ser atribuido a una inestabilidad de las plantas micropropagadas debido a la falta de raíces primarias (Selby y Seaby 1982); así como a la incidencia de malformaciones en el sistema radicular (Mc Keand y Allien 1984).

El éxito con un sistema organogénético determinado no es garantía para asegurar una respuesta favorable en otra especie (Bergmann, 1992). Un ejemplo claro es lo reportado por Saravitz (1996), que trabajando con dos especies simultáneamente logró el enraizamiento en *Pinus virginiana* pero no la aclimatación. Sin embargo, con *Abies fraseri* tuvo éxito tanto en el enraizamiento como en la aclimatación.

En resumen, para la propagación clonal de especies forestales es imprescindible desarrollar un sistema de reproducción que sea exitoso. Sin embargo, para lograr lo anterior, es necesario adaptar un protocolo modelo ya establecido y modificarlo, para cada especie en particular (Jong y Tainer, 1991).

Existen protocolos de micropropagación a escala de laboratorio, para más de 50 coníferas (Thorpe *et al.*, 1990; Schestibratov *et al.*, 2006). Como resultado del presente estudio, a ésta lista puede ser añadido *Pinus maximartinezii*. Así mismo, es importante destacar la aplicación de éstas técnicas en la conservación de material genético de poblaciones endémicas amenazadas (Charls y Pence 2004; Hargreaves *et al.*, 2004).

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos bajo las condiciones desarrolladas de esta investigación y considerando la discusión de la misma, se derivan las siguientes conclusiones:

- Las condiciones de pretratamiento y de desinfección de las semillas fueron las adecuadas para lograr el éxito del establecimiento aséptico de la especie, ya que se obtuvo 100% de supervivencia y 0% de contaminación en explantes.
- Obtener el mayor número de propágulos en la micropropagación de una especie es uno de los objetivos más importantes. Los mejores resultados se derivaron utilizando embriones cigóticos cultivados en el medio DCR adicionado con 0.5 y 0.01 mg^l⁻¹ de BAP y ANA respectivamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

- Así mismo, el número de brotes fue mayor al incrementarse la concentración, por lo que, para un nuevo estudio se recomienda estudiar concentraciones mayores a 0.5 mg^l⁻¹ de BAP.
- El tratamiento de pulso con AIB por 24 h. resultó superior para la fase de enraizamiento *in vitro*. Sin embargo, para optimizar el enraizamiento se recomienda hacer modificaciones específicas a los tratamientos utilizados ya que

deben ser investigados sus requerimientos para mejorar el porcentaje de respuesta de los brotes establecidos *in vitro*

- En el tercer experimento se demostró que el enraizamiento es independiente del medio de cultivo, la formación de raíces se obtuvo al incrementarse el tiempo de pulso logrando un 17% de plantas con raíz. Por lo que, la regeneración de raíces observada demuestra la capacidad de ésta especie para ser propagada *in vitro*; lo cual nos puede llevar a establecer un protocolo para la micropropagación de *Pinus maximartinezii*. Esta respuesta podría indicar que el tiempo al pulso pudiera ser un factor importante en la emisión de raíces en los brotes de esta especie.

- Así mismo, se recomienda para el enraizamiento *in vivo* seguir investigando la dosis óptima y técnica más adecuada para la aplicación de auxinas y de hongos micorrizicos, para mejorar la respuesta en éstas condiciones de plantas con raíz.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

- En general, la metodología utilizada para la aclimatación de plantas fue adecuada sin embargo, se sugiere seguir estudiando los factores que pudieran estar involucrados con la supervivencia de las plántulas obtenidas *in vitro*.

- El protocolo desarrollado en este estudio permite propagar *Pinus maximartinezii* a través del cultivo *in vitro*, ofreciendo una vía adecuada para multiplicar y preservar esta especie en peligro de extinción a través de la metodología propuesta en este trabajo.

LITERATURA CITADA

Aitken-Christie J, Singh AP. 1987. Cold storage of tissue cultures. In Cell culture and tissue culture in forestry. Vol. 2 Edited by J.M. Bonga and D.J. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. 285-303pp.

Altman A. 2003. From plant tissue culture to biotechnology: Scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 39: 72- 75.

Andersone U, Ievinsh G. 2000. Effect of hormonal and nutritional factors on morphogenesis of *Pinus sylvestris* L. *in vitro*. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B 54:58-62.

Andersone U, Ievinsh G. 2002. Changes of morphogenic competence in Mature *Pinus sylvestris* L. Buds *in vitro*. Annals of Botany. 90:293-298.

Arrillaga I, Segura J, Renal-Morata B, Ollero J. 2005. Factors influencing axillary shoot proliferation and adventitious budding in cedar. Tree Physiology. 25: 477-486.

Atree SM, Fowke LC. 1991. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. (ed) in Y. P. S. Bajaj. Biotechnology in agriculture and Forestry. Vol. 17. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Canada. 53-70.

Barba A. 2001. Micropropagación de plantas. (Ed.) Trillas, México. p 27.

Bergmann BA. 1992. Genotype influence on adventitious organogenesis and susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* in *Pinus*. Ph D. Dissertation. North Caroline State University. USA. 129 p.

Bronso MR, Dixon. 1991. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons. New Forests. 5: 277-288.

Burkhart LF. 1991. Establishment, shoot multiplication, and rooting of *Pinus strobus*, *Pseudotsuga menziesii*, and *Thuja occidentalis* Hertz Nintergreen. Ph. D. Dissertation. University of Alberta. Canada 215 p.

Capuana M. 2001. Cloning of Italian forest tree species by *in vitro* techniques. Ph. D. Dissertation. University Gent. Belgium. 116.

Charbonneau J, Laliberte S. 2004. *In Vitro* and cellular responses of Jack pine embryos to three imbibitions parameters. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 40:559-568.

Charls SM, Pence VC. 2004. *In vitro* propagation and acclimation of von Park Harebells (*Crotalaria avonensis*), an endangered Florida species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 59 A. p 2064.

Chesick EE, Mohn CA, Hackett WP. 1991. Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos *in vitro*; bud induction and rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 26: 107-114.

Chin-Yi L, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. 1991. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sorg). *Bot. Gaz.* 152: 42-50.

Delgado VP. 2002. Estructura poblacional, variación genética y conservación de cinco especies del género *Pinus*, endémicas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. D.F.

Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México, D.F.

Escoto CC. 1988. La importancia de los pinos piñoneros en el estado de Zacatecas. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales, U.A.CH.

Fay M. 1994. In what situations is *in vitro* culture apropiate to plant conservation. *Biodiversity and Conservation* 3:176-183.

Flinn BS, Wedd DT, Georgis W. 1985. *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Can. J. Bot.* 64: 1948-1956.

Gladfelter HJ, Phillips GC. 1987. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Rep.* 6: 163-166.

Go NE, Pérez-Orozco GD, Halos SC. 1993. *In vitro* response of embryos from different provenants of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 1-7.

Gonzalez MV, Rey M, Tabaza R, La Malfa S, Cuozzo L, Ancora L. 1998. *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *HortScience* 33: 749-750.