



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

INDUCCION DE BROTES ADVENTICIOS  
EN EMBRIONES DE Pinus cembroides  
ZUCC. CULTIVADOS in vitro

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

ALEJANDRO CRUZ RAMOS VILLASEÑOR

1 9 9 0



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A la memoria de mi padre

A mi madre, hermanos y sobrinos

A Mercedes

A mi pequeña Aralia

A la ENEP Iztacala

A la UNAM

A mis buenos profesores

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas e instituciones por sus aportaciones hechas para la realización del presente trabajo.

Al Laboratorio de Embriogénesis del Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, por las facilidades, equipo e instalaciones proporcionadas.

Al Dr. Héctor González Rosas por la oportunidad, apoyo y sugerencias hechas durante el desarrollo del trabajo.

A mi hermana Alicia Ramos Villaseñor por su constante motivación.

A la srta. Angélica Camacho Acosta por las facilidades para mecanografiar el presente trabajo.



## CONTENIDO

	PAG.
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Importancia del <u>Pinus cembroides</u> Zucc. ....	4
2.1.1 Distribución.....	4
2.1.2 Descripción botánica.....	4
2.1.3 Usos.....	5
2.2 Cultivo <u>in vitro</u> de coníferas.....	5
2.2.1 Antecedentes históricos.....	5
2.2.2 Principales inóculos en los cultivos <u>in vitro</u> .....	5
2.2.3 Inducción de yemas adventicias.....	6
2.2.3.1 Cultivo de callo.....	6
2.2.3.2 Cultivos en suspensión.....	9
2.2.3.3 Cultivo de embriones.....	11
2.2.3.4 Cultivo de ascúculas.....	19
2.2.3.5 Cultivo de brotes apicales y axilares.....	20
2.2.4 Formación de raíz.....	21
2.3 Factores que intervienen en el cultivo <u>in vitro</u> .....	23
2.3.1 Selección del inóculo.....	23

	PAG.
2.3.2 Epoca de colecta del inóculo.....	25
2.3.3 Tamaño del inóculo.....	26
2.3.4 Asépsia del inóculo.....	26
2.3.5 Medio de cultivo.....	27
2.3.6 Reguladores de crecimiento.....	31
2.3.7 Condiciones de cultivo.....	38
2.4 Aplicación del cultivo in vitro de árboles	38
3. MATERIALES Y METODOS.....	43
3.1 Establecimiento del inóculo.....	43
3.1.1 Disección del inóculo.....	43
3.1.2 Medio de cultivo.....	44
3.1.3 Reguladores de crecimiento.....	46
3.2 Multiplicación del inóculo.....	46
3.3 Enraizamiento <u>in vitro</u> .....	46
3.3.1 Reducción de la concentración del medio y sacarosa.....	49
3.3.2 Aplicación de enraizador en polvo...	49
3.3.3 Aplicación de enraizador líquido....	50
3.3.4 Tratamientos de ANA y AIB.....	50
3.3.5 Adición de enraizador líquido al medio de cultivo.....	51
3.3.6 Combinación de auxinas con BA y variación de sacarosa con AIB.....	52
3.3.7 Transferencia al medio DCR sin reguladores.....	52

	PAG.
3.4 Enraizamiento extra <u>in vitro</u> .....	52
3.4.1 Transferencia de brotes a una mezcla de tierra de monte/agrolita.....	52
3.4.2 Transferencia a la tierra de monte/- agrolita después de un tratamiento con ANA y AIB.....	54
3.5 Toma de datos.....	54
3.5.1 Análisis estadístico.....	55
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
4.1 Respuesta del inóculo durante el estableci- miento e inducción.....	57
4.1.1 Desinfestación y medios de cultivo...	57
4.1.2 Efecto de los reguladores de crecimien- to.....	59
4.1.3 Tiempo de inducción de brotes.....	68
4.1.4 Zonas de formación de los brotes sobre los embriones.....	72
4.1.5 Características de los brotes.....	72
4.1.6 Análisis estadístico para la formación de brotes.....	76
4.2 Crecimiento de los brotes.....	79
4.3 Respuestas de los brotes durante la inducción de raíz.....	82
4.3.1 Respuestas a los ensayos <u>in vitro</u> ....	82
4.3.1.1 Efecto de la reducción de la concentración de sacarosa y del medio SH.....	82

4.3.1.2 Efecto del enraizador en pol <u>u</u> vo y líquido.....	84
4.3.1.3 Efecto de la combinación de ANA y AIB en el medio SH....	86
4.3.1.4 Efecto del medio DCR.....	88
4.3.1.5 Efecto de las combinaciones de auxinas con BA y AIB con sacarosa en el medio DCR....	88
4.3.1.5 Efecto del enraizador líquido adicionado al medio DCR.....	89
4.3.2 Extra <u>in vitro</u> .....	89
5. CONCLUSIONES.....	94
6. BIBLIOGRAFIA.....	96
ANEXO I .....	103
ANEXO II .....	105

## INDICE DE CUADROS

CUADRO		PAG.
1	Composición de algunos medios usados en el cultivo <u>in vitro</u> .	29
2	Medios empleados en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.	45
3	Combinaciones de ANA y BA establecidos para inducir brotes adventicios en el medio SH.	47
4	Combinaciones de ANA y BA establecidos para inducir brotes adventicios en el medio DCR.	48
5	Reducción del medio básico SH al 50% de sacarosa con carbón activado para inducir raíz.	49
6	Tratamientos de ANA y AIB para inducir raíz a brotes de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.	51
7	Tratamientos con " Radix " adicionado al medio DCR.	51
8	Combinaciones de auxinas (AIB y ANA) con BA y variación de la concentración de sacarosa con AIB para inducción de raíz.	53
9	Efecto de los tratamientos sobre los embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc. cultivados en el medio SH durante la inducción de brotes adventicios.	58
10	Efecto de los tratamientos sobre los embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc. cultivados en el medio DCR durante la inducción de brotes adventicios.	62
11	Intensidad de respuesta a los diferentes tratamientos durante la inducción de brotes adventicios en el medio SH, en embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.	73

CUADRO		PAG.
12	Intensidad de respuesta a los diferentes tratamientos durante la inducción de brotes adventicios en el medio DCR, en embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.	75
13	Análisis de varianza para la formación de brotes de embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.,cultivados en el medio SH.	77
14	Comparación de medias para el número de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos en el medio SH.	78
15	Análisis de varianza para la formación de brotes en embriones de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.,cultivados en el medio DCR.	80

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	Regeneración de árboles a partir del cultivo de callo somático o cultivos en suspensión.	7
2	Proceso de morfogénesis o diferenciación <u>in vitro</u> .	10
3	Hibridación intragenérica por fusión de protoplastos e hibridación intergenérica por transformación.	12
4	Fases del cultivo de embriones de pino.	14
5	Gradiente de juvenilidad en coníferas.	24
6	Auxinas y citocininas más usadas en el cultivo <u>in vitro</u> .	32
7	Relación entre los trabajos que han obtenido morfogénesis satisfactoria en coníferas con la concentración molar de los reguladores de crecimiento.	34
8	Comparación de las ganancias genéticas obtenidas con la propagación sexual y vegetativa de árboles plus seleccionados.	35
9	Ciclo de propagación vegetativa para muchas coníferas.	40
10	Regeneración de árboles homocigóticos diploides de plantas haploides regeneradas a partir de microsporas obtenidos del cultivo del gametofito masculino.	42
11	Efecto de las combinaciones de ANA y BA en la formación de brotes adventicios en el medio SH.	60
12	Efecto de las combinaciones de ANA y BA en la formación de brotes adventicios en el medio DCR.	63

FIGURA		PAG.
13	Número de brotes obtenidos por tratamiento en el medio SH.	65
14	Número de brotes obtenidos por tratamiento en el medio DCR.	67
15	Inicio del cultivo de embriones en el medio SH, del <u>Pinus cembroides</u> Zucc., a seis días.	69
16	Formación de yemas adventicias sobre coti ledones y zona del epicótilo; se observa <u>ca</u> llo en la radícula.	70
17	Desarrollo de las yemas adventicias a brotes. En el medio SH sin reguladores de crecimiento.	81
18	Brotos disectados para su alargamiento en el medio SH sin reguladores de crecimiento.	83
19	Formación de callo en la base del brote, después de aplicar el enraizador en polvo (10 000 ppm de AIB y 300 ppm de ANA) y <u>culti</u> vado en el medio SH sin reguladores.	85
20	Efecto del enraizador " Radix " (10 000 mg de AIB y 30 mg de ANA) aplicado en la base del brote y cultivados en el medio SH sin <u>regula</u> dores.	87
21	Brotos transferidos a tierra de monte/agrolita (2:1 v/v) bajo condiciones no asépticas, se observa el crecimiento de un brote lateral.	91
22	Efecto residual de las auxinas (ANA 0.01 mgL <sup>-1</sup> con 1.0 mgL <sup>-1</sup> de AIB) después de transferir el brote a la mezcla de tierra de monte/agrolita (2:1 v/v).	93



## RESUMEN

El Pinus cembroides Zucc. es uno de los pinos piñoneros que crece en regiones áridas y semiáridas del país, se emplea en la recuperación de áreas deforestadas, su semilla se usa como complemento alimenticio, además su madera se utiliza en la construcción de muebles rústicos y como árbol ornamental en las zonas urbanas.

La disminución constante de bosques y selvas del territorio nacional es uno de los grandes problemas a resolver y las técnicas del cultivo in vitro, ha mostrado ser una alternativa en la propagación y mejoramiento de las especies forestales.

En éste trabajo se plantea conocer los procesos morfogenéticos producidos sobre los embriones de Pinus cembroides cultivados in vitro, con el suministro de ácido naftaleacético (ANA) y benciladenina (BA) en diferentes concentraciones para inducir la formación de brotes adventicios y mostrar así el potencial de la técnica en la propagación.

Para ello se utilizó semilla de polinización abierta, colectada en el municipio de Zaragoza del estado de Nuevo León. Los embriones se disectaron y se colocaron en el medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) o en el DCR (Gupta y Durzan, 1985), adicionados con ANA y BA solos o combinados y se colocaron en un cuarto de incubación.

Los resultados muestran que en ambos medios de cultivo se obtuvo la formación de brotes adventicios, siendo los mejores tratamientos en el medio SH ( $10^{-4}$  molar de BA;  $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-6}$  ó  $10^{-5}$  molar de BA., y con el medio DCR

con  $10^{-7}$  molar de ANA con  $2.5 \times 10^{-5}$  ó  $10^{-4}$  molar de BA.

El alargamiento de los brotes se obtuvo por la transferencia del embrión o los brotes disectados al medio SH sin reguladores de crecimiento y con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa.

Finalmente se hicieron varios ensayos in vitro y extra in vitro para inducir la formación de raíz a los brotes obtenidos. Se emplearon diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), variación en la concentración de sacarosa y aplicación de enraizadores comerciales en polvo y líquido.

La metodología para la obtención de brotes adventicios en embriones de Pinus cembroides Zucc., queda establecida y muestra el potencial de la técnica en la propagación masiva y su posible aplicación en el mejoramiento de la especie una vez que se obtenga el enraizado de los brotes y se puedan hacer evaluaciones en suelo y campo.

## INTRODUCCION

En la propagación de árboles forestales, una de las principales finalidades es la de incrementar la productividad del bosque y con la ayuda de las técnicas de mejoramiento genético aumentar la calidad del arbolado. En la reforestación se debe usar material parental seleccionado para garantizar el futuro rendimiento del bosque.

México no cuenta con programas para el mantenimiento y recuperación del bosque, mucho menos para incrementar su productividad lo que hace necesario buscar opciones que proporcionen una rápida propagación a gran escala en un menor tiempo.

Las especies del género Pinus siguen siendo la base de la industria maderera en México. El Pinus cembroides Zucc. si bien no es una especie maderera por excelencia, tiene otras no menos importantes características, como la de producir semilla, comunmente llamada piñon muy apreciada como complemento alimenticio, además ecológicamente, puede resultar relevante en la recuperación de suelos y en la reforestación ya que es una especie que se adapta a climas secos.

Las técnicas de cultivo in vitro aplicadas a especies forestales, abren muchas perspectivas en diversas áreas, entre ellas estan las de plantaciones forestales y el mejoramiento genético. Estas técnicas son un método en la propagación vegetativa y que puede tener mayor ventaja que los métodos tradicionales como: los injertos, enraizado de estacas y los acodos.

Actualmente las técnicas de cultivo in vitro se han venido desarrollando y afinando continuamente en la micro-propagación de árboles. Los resultados obtenidos en muchas especies demuestran el potencial de ésta técnica.

En México los trabajos en cultivo in vitro realizados en especies forestales, son pocos y aislados ya que no forman parte de un programa, que debieran ser de carácter nacional por lo cual es necesario incrementarlos por la gran diversidad de especies importantes que tenemos.

Por lo anterior la presente investigación tuvo los objetivos siguientes:

- . Conocer el comportamiento de los embriones de Pinus cembroides Zucc. cultivados en condiciones in vitro.
- . Determinar los efectos morfogénéticos que puedan producir las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados (ANA y BA) sobre los embriones.
- . Disectar y estimular el crecimiento de los brotes.
- . Inducir raíz en los brotes aislados y alargados para mostrar así el potencial que genera el cultivo in vitro en la propagación y mejoramiento de las especies forestales de México.

Simultáneamente se probarán las hipótesis siguientes:

- . La brotación múltiple se obtendrá manipulando los reguladores adicionados solos o combinados en los medios de cultivo.

- . El alargamiento de los brotes se logra, ya sea mediante la eliminación de los reguladores de crecimiento y/o con la reducción de sacarosa del medio de cultivo.
- . La formación de raíz se logra mediante la reducción de la concentración del medio de cultivo y la de sacarosa o por el suministro de una auxina al medio de cultivo.

También el enraizado de brotes se obtiene por la aplicación de enraizadores comerciales a los brotes bajo condiciones in vitro y extra in vitro.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia del Pinus cembroides Zucc.

#### 2.1.1 Distribución

Es el más importante de los pinos piñoneros, su distribución es muy amplia en el territorio nacional, la cual se inicia desde la frontera norte, hasta la parte central, se ha colectado en los estados de Baja California Norte y Sur, Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango, Zacatecas, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, México, Querétaro, Aguascalientes, Veracruz y Puebla (Eguiluz, 1978 y 1985).

#### 2.1.2 Descripción botánica

Son árboles de 5 a 15 m de altura y con un diámetro que va de 30 hasta 70 cm; su copa es piramidal o redondeada, con ramas ascendentes delgadas y colocadas irregularmente; la corteza es cenicienta, delgada y agrietada, dividida en placas cortas. Las ascúculas se presentan en grupos de tres a veces en dos, cuatro y cinco, de color azul pálido, borde entero, con dos canales resiníferos externos y un haz vascular; los conos son globosos de 5 a 6 cm de diámetro y en grupos hasta de 5, abren en los meses de noviembre y diciembre.

Las semillas son subcilíndricas, ligeramente triangulares sin ala de 5 a 6 mm de longitud algunas hasta 10 mm, son morenas a negruscas, abultadas en la parte superior y delgadas hacia la base, los embriones tienen de 3 a 14 hojas cotiledonares; la producción de semilla no es sostenida, suele ser muy abundante en los años semilleros (Martínez, 1948; Eguiluz, 1978 y 1985; Niembro, 1986).

### 2.1.3 Usos

Las semillas son ampliamente apreciadas como complemento alimenticio. Su madera se usa como leña, para elaborar carbón y muebles rústicos; por sus hábitos de crecimiento se le usa en la recuperación de suelos y debido a que crece en lugares secos puede jugar un papel importante para disminuir la desertización del país (Eguiluz, 1978, 1985 y Niembro, 1986).

## 2.2 Cultivo in vitro de coníferas.

### 2.2.1 Antecedentes históricos.

Los primeros trabajos realizados en coníferas bajo condiciones in vitro corresponden a Schmidt (1924) y Gautheret (1934) quien describió el desarrollo y citología de la formación de callo en inóculos de tejido cambial de un pino el Pinus pinaster. Subsecuentemente muchos trabajos se han venido haciendo, se pueden consultar las revisiones hechas por: Durzan y Campbell (1974); Winton y Huntinen (1976); Bonga (1977) Y la de David (1982).

### 2.2.2 Principales inóculos en los cultivos in vitro.

Los tejidos del cambio fueron los usados al principio, en la actualidad la diversidad de éstos es más grande, por lo que se habla del cultivo de : gametofitos, meristemas, raíces, yemas, ascúlas, embriones o protoplastos. La mayoría de estos cultivos están dirigidos a formar nuevas plantas, induciendo la formación de yemas adventicias sobre el inóculo directamente o a través de tejido desdiferenciado (callo) o células. Los autores agrupan de manera diferente las modalidades del cultivo in vitro como puede observarse en la mencionadas por David (1982) y John (1983), a continuación se dan algunas de estas modalidades, en el cultivo in vitro de coníferas.

### 2.2.3 Inducción de yemas adventicias

#### 2.2.3.1 Cultivo de callo

Los callos son tejidos indiferenciados o desorganizados morfofisiológicamente, que derivan de un inóculo y a los que posteriormente se les induce una respuesta morfogenética. La obtención de callos se logra generalmente por la manipulación de las concentraciones de auxinas en el medio de cultivo, las cuales pueden ser individualmente o combinadas con citocininas (David, 1882; John, 1983 y Vidalie, et al, 1986). (ver figura 1).

Las respuestas morfogenéticas, suelen ser específicas para cada especie o tipo de inóculo, como lo demuestra el trabajo de Minocha (1980), en el que probó cerca de 100 combinaciones de auxina-citocinina, sin obtener respuesta morfogenética en callo derivado de Pinus strobus.

Washer, Reilly y Barnett (1977) usaron segmentos de hipocotilos de plántulas de 8 días de Pinus contorta y encontraron diferencias en el desarrollo del callo, debido a las variaciones en la concentración de los nutrimentos del medio, pero no lograron obtener estructuras diferenciadas.

Salmia (1975) en un estudio citológico derivado de Pinus cembra se observó que el crecimiento del callo no se alteró con el número de transferencias; no se logró inducir brotes ni raíces. Determinó el número de una citodiferenciación, donde el 86% de la mitosis fueron diploides y en menor frecuencia se presentaron otros grados de ploidía como haploides y tetraploides.

Simola y Honkanen (1983) derivaron callo de megagametofitos inmaduros de Picea abies, estuvo formado por cerca del 50% de células haploides, aunque también se observaron diploides y mezcla de ambas. El efecto de ciertas poliamidas favore-





Figura 1. Regeneración de árboles a partir del cultivo de callo somático o cultivos en suspensión.  
 Tomado de Winton y Huhtinen (1976).

cieron el desarrollo de raíces y en cinco callos se formaron brotes y raíces pero no estuvieron conectados. Finalmente consideran que la capacidad de diferenciación de callos en cultivo, no se debe a la inestabilidad citológica.

Mehra y Anand (1983) usaron diferentes estructuras vegetativas de Pinus roxburghii como: cotiledones, hipocótilos, yemas apicales y puntas de raíz, obtenidas de plantas de 3 a 5 semanas, las estructuras fueron expuestas a diferentes auxinas ( ANA, AIB y 2,4-D ) solas o combinadas con cinetina o BA, además agua de coco y caseína hidrolizada. Observaron que el crecimiento del callo no decrece con los subcultivos y el estudio citológico reveló que las células eran predominantemente diploides de la cuarta a la décimosegunda semana, aunque también hubo poliploides y aneuploides.

El callo derivado de segmentos de hipocótilos de Liquidambar styraciflua, fue posible inducir diferenciación de brotes y raíces y se muestra la formación de estomas, primordios de hojas y de raíces, aunque hay que considerar que en este caso no se trata de una conífera ( Bircham, Sommer y Brown, 1981 ).

La diferenciación de plantas en gimnospermas a partir del cultivo de callo, no ha sido demostrado satisfactoriamente ya que faltan muchas investigaciones sobre los aspectos nutricionales y hormonales para su crecimiento y para la subsecuente diferenciación a plantas, por lo que resulta necesario hacerlo para cada especie ( Mehra y Anand, 1983 ). Cuando llegue a dominarse la organogénesis de callos y de colonias de células asociadas a un determinado origen o procedencia, se abrirá la puerta para producir un número ilimitado de propágulos ( David, 1982 ).

### 2.2.3.2 Cultivos en suspensión

El cultivo de células en medio líquido, derivadas de callo ofrece un gran potencial en la propagación de genotipos selectos, partiendo de la activa división celular y que las células pueden desarrollar embriones que posteriormente originen plantas completas, es parte de lo que plantea el cultivo en suspensión (John, 1983). (ver figura 1 y 2).

El origen del callo empleado en los cultivos en suspensión pueden provenir de diferentes tipos de inóculos, por ejemplo : Konar (1963) puso en un medio líquido a 300 agitaciones por minuto callo derivado de segmentos de hipocotilos de Pinus gerardiana y observó que las células individuales formaron hileras constituidas por 3 a 4 células, que mostraron divisiones posteriores, pero cuando se retiraron del medio líquido el crecimiento fue poco o nulo en el subcultivo.

La obtención de pequeños embrioides de 5 a 10 células fueron producidas por Chalupa y Durzan (1973), al hacer repetidas transferencias de los cultivos del callo de Picea abies. Winton y Verhagen (1977) por su parte obtuvieron embrioides de 3 a 5 células en callo derivado de Pinus taeda y Pseudotsuga menziesii.

Los resultados obtenidos en los cultivos en suspensión animan, ya que parece solo cuestión de tiempo para que el mayor problema sea resuelto: la formación de plantas a partir de embrioides. Estos permitirán producir cantidades infinitas de cualquier fenotipo o especie, sin embargo en los cultivos de callo se debe tener cuidado en que los genotipos permanezcan estables (John, 1983).

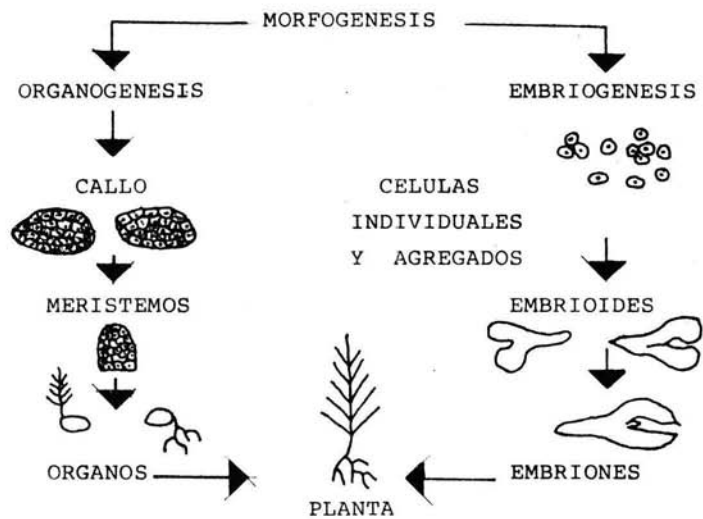


Figura 2. Proceso de morfogénesis o diferenciación in vitro. Tomado de Winton (1978).

El cultivo de protoplastos se puede considerar como una modalidad de los cultivos en suspensión que proporcionan perspectivas para combinación de genes, por la fusión de células somáticas de diferentes especies o por la incorporación de información genética foránea a las células seleccionadas, produciendo así híbridos parasexuales de especies que sean sexualmente incompatibles. Un análisis sobre los problemas y perspectivas en el aislamiento, cultivo y fusión de protoplastos es dado por Ahuja (1982) quien recalca que los trabajos de ésta índole en las especies forestales, principalmente en coníferas son muy escasos. David, et al. (1982), obtuvieron agregados de 10 a 15 células después de 20 días en cultivo de protoplastos derivados de cotiledones de Pinus pinaster, y realizan un análisis sobre los factores que afectan la producción y viabilidad de los protoplastos. (ver figura 3).

#### 2.2.3.3 Cultivo de embriones

Las observaciones de muchos investigadores a la inestabilidad genética de los cultivos de callo y en suspensión y a los resultados parciales obtenidos en la regeneración ha encaminado las investigaciones a la formación de yemas en otras fuentes de inóculos, principalmente en regiones meristemáticas o en tejidos jóvenes. Los embriones o estructuras embrionarias como : hojas cotiledonares, hipocótilos y epicótilos obtenidos por la germinación de semillas, están siendo empleadas en la micropropagación. La formación de brotes en estos inóculos es antecedida por la inducción de yemas - (David, 1982). (ver figura 4).

Muchas semillas de coníferas presentan estado de latencia en el cual, los embriones son incapaces de crecer por lo que resulta conveniente someterlas a una estratificación para que recupere su actividad metabólica (Harold y Hocker,

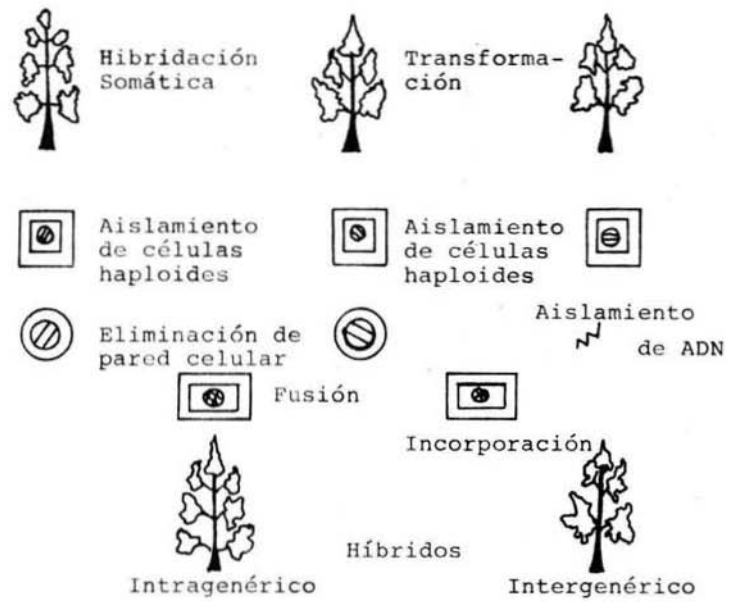


Figura 3. Hibridación intragenérica por fusión de protoplastos e hibridación intergenérica por transformación. Tomado de Winton y Huhtinen (1976).

1984), sin embargo Webb y Street (1977), en semillas de Pinus contorta y Picea sitchensis, no encontraron diferencias entre la estratificación y la viabilidad de los embriones usados en el cultivo, además determinaron que la intensidad luminosa influye en la inducción de brotación.

Un efecto del fotoperíodo en la organogénesis con relación al medio de cultivo y reguladores empleados, fue observado en embriones y cotiledones de Pinus brutia por Abdullah, et al. (1985).

Arnold y Eriksson (1978) estudiaron el efecto de la temperatura en la formación de yemas adventicias y mencionan que a bajas temperaturas (15°C), los embriones de Picea abies permanecieron vivos pero no desarrollaron; a temperaturas elevadas (mayores a los 30 °C) los embriones perecieron. Las temperaturas donde se obtuvo mayor formación de brotes fueron los 20 a 25 °C y con respecto al fotoperíodo el suministro de luz continua fue superior a cualquier combinación de luz/oscuridad.

Kolevska, et al., (1983) consideran que el medio de cultivo empleado y su concentración pueden influir en la formación de yemas. Vargas (1982) muestra que el tipo de medio empleado determina el grado de respuesta en embriones y estructuras embrionarias de Pinus patula y además expone que la acción de las auxinas y citocininas son determinantes en el proceso morfogénético.

El efecto de algunos componentes del medio de cultivo, también participan en la inducción de yemas: Ellis y Bilderback (1984) mencionan que las fuentes de nitrógeno pueden inhibir la brotación en los cotiledones de embriones de Pinus ponderosa.

Konar y Singh (1980) muestran que la concentración de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) de 200 a 1400 mg L<sup>-1</sup> afecta la res

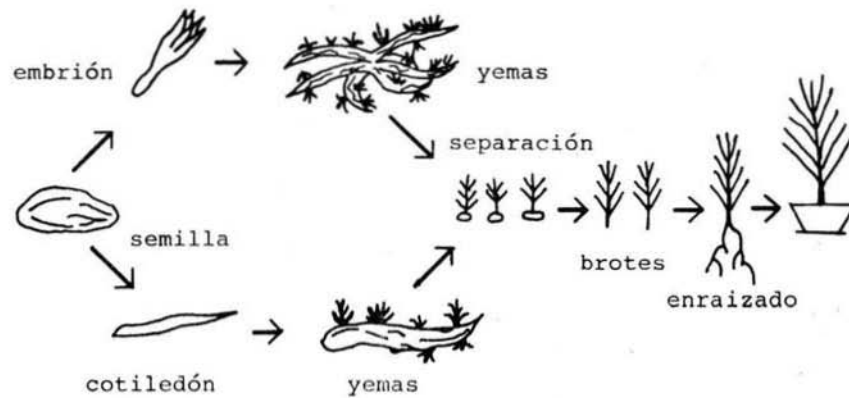


Figura 4. Fases del cultivo de embriones de pino.  
Tomado de Mott et al., (1977).



puesta del inóculo encontraron que la baja concentración produce el mejor crecimiento de embriones e hipocótilos de Pinus wallichiana.

Abdullah, et al (1985) compararon tres medios de cultivo diferentes (SH, GD, y LS) y determinaron que el mejor fue el SH, consideran que los altos niveles de potasio causan efectos benéficos para la organogénesis.

La concentración de sacarosa u otra fuente de carbono interviene en la formación de yemas. Minocha (1980) determina la concentración óptima de sacarosa (3%) después de ensayar concentraciones de 1 a 6 % , además menciona que concentraciones semejantes de fructosa y glucosa fueron igualmente efectivas en embriones de Pinus ponderosa.

Arnold y Eriksson (1981) no encontraron diferencias en la formación de yemas sobre embriones de Pinus contorta al variar la concentración de sacarosa de 25 a 200 milimoles sin embargo Arnold (1987) estudia el efecto de la concentración de sacarosa en relación a la acumulación de almidón en embriones de Picea abies y su relación con la formación de yemas muestra que los centros de formación de yemas se pueden establecer con carencia de sacarosa en el medio de cultivo, pero que resulta necesaria para el desarrollo a brotes. La acumulación de almidón se detecta desde el primer día en cultivo con sacarosa y se localiza principalmente en el cortex y aumenta con la concentración de sacarosa. En las células meristemáticas no se observa acumulación de almidón, finalmente manifiesta que no existe correlación entre la acumulación de almidón y la iniciación de yemas adventicias.

En la gran mayoría de los casos, la inducción de yemas adventicias se produce por la acción de las citocininas, so

las o combinadas con auxinas que generan los centros meristemáticos sobre las células epidermales y subepidermales de los cotiledones, epicótilos (Sommer, et al., 1977) e hipocótilos (Reilly y Brown, 1976; Reilly y Washer, 1977 y Toribio y Pardos, 1981).

Arnold y Eriksson (1981) observaron que la inducción de yemas fue más lenta y en menor número en concentraciones elevadas de BA comparadas con la mejor que fue  $10^{-5}$  molar.

La combinación de BA ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ) con ANA y AIB (1.25 y  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) mejoró el porcentaje de inducción de yemas en embriones de Pinus nigra (Kolevska, et al., 1983). La formación de brotes adventicios en embriones de Pinus strobus por el efecto de una auxina (AIB a 1, 2 y  $5 \text{ mgL}^{-1}$ ) lo señala Minocha (1980) aunque los mejores tratamientos fueron combinaciones de AIB con BA y la aplicación de TIBA solo o combinado con BA incrementa la respuesta.

El efecto de otras citocininas en la inducción de yemas en embriones, muestran una menor capacidad que el BA, tal es el caso de la cinetina, zeatina y el 2iP. Cheng (1975) observa la formación de yemas en embriones de --- Pseudotsuga menziesii con altas concentraciones de BA y 2iP ( $0.5$  y  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$ ). El 2iP resulta poco efectivo en la inducción de yemas en embriones de Pinus contorta y el suministro de zeatina no promueve crecimiento de callo ni la inducción de yemas (Webb y Street, 1977).

El suministro de BA fue indispensable para la inducción de yemas en embriones de Pinus ponderosa, pero la adición de auxinas incremento la respuesta (Ellis y Bilderback, 1984).

La intensidad y desarrollo homogéneo de los brotes, - depende del contacto que tenga el inóculo con el medio de cultivo. Reilly y Washer (1977) detectaron dos respuestas sobre los cotiledones; los que estuvieron en contacto con el medio formaron yemas más uniformemente que los que no estuvieron, limitándose a formar pequeños brotes en las puntas. Aitken, et al., (1981) observaron un desarrollo asincrónico de los brotes que se formaron en los cotiledones de los embriones de Pinus radiata, pero cuando se cortaron los cotiledones y se colocaron sobre el medio de cultivo, la respuesta se incrementó y el desarrollo fue más sincrónico.

La variabilidad en el número de yemas en cualquier medio, se debe en gran parte a la diversidad genética de los embriones y también al hecho de que las primeras yemas son producidas sobre los cotiledones que están en contacto con el medio (Ellis y Bilderback, 1984).

La reducción en la concentración del medio, así como - la eliminación de los reguladores de crecimiento, favorece el desarrollo de las yemas a la formación de brotes. Cheng (1975) menciona que el crecimiento de las yemas adventicias fué estimulada por la baja concentración del medio sin reguladores; además observa que la formación de las yemas disminuye con los subcultivos. Al contar las yemas obtenidas en los cotiledones de embriones de Pinus palustris y transferidas al medio que fué o no suplementado con AIB, BA y cloruro de amonio, se observó que en las primeras semanas ocurrió la formación de ascúculas primarias y que de algunos brotes se dió la organogénesis de raíces (Sommer, et al., 1975).

El alargamiento de los brotes a partir de yemas inducidas en los cotiledones y epicótilos de embriones de Pinus nigra, se logra solo si se transferían al medio sin reguladores (Jelaska, et al., 1981). En la misma especie Kollavska, et al., (1983) mencionan, que cuando los embriones con yemas formadas se transfirieron al medio sin reguladores, el callo formado sobrecreció alcanzando las yemas, por lo que fue necesario separarlas para que logaran desarrollarse a brotes.

El suministro de AIA al medio de cultivo a bajas concentraciones ( $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  molar) estimula el crecimiento de las yemas de Pseudotsuga menziesii (Boulay y Francllet, 1977). y el suministro de carbón activado (0.5 %) y la reducción de la concentración del medio a 1/4 favorece el crecimiento de los brotes aislados (Arnold y Ericksson, - 1981). Konar y Singh (1980) observan que el alargamiento de las yemas a brotes se logra cuando se suministra agua de coco al medio.

David (1982) menciona que las condiciones que estimulan una abundante inducción inhibe el crecimiento continuo de los brotes y que su transferencia a un medio sin citocininas y con muy bajas concentraciones de auxinas estimulan el alargamiento; además señala que para el alargamiento de los brotes, es necesario la formación del sistema radicular y que en condiciones in vitro el alargamiento es en proporción más lento que in situ, demostrando que los medios de cultivo no compensan la ausencia del sistema radicular. Lo anterior demuestra que no existe un estudio sistemático para la inducción y formación de plántulas a partir de yemas a brotes.

Cuando los inóculos provenientes de plántulas, los tejidos tienden a disminuir su capacidad morfogénica con la edad, Toribio y Pardos (1981) observaron que los tejidos

jóvenes tienen gran plasticidad morfogénica y mencionan - que existen células específicas determinadas genéticamente para el proceso de organogénesis y que los reguladores de crecimiento activan dichas células. Hricova et al., (1981) se ñalan que la habilidad de regeneración en el cultivo de tejidos depende de la edad del inóculo, de las condiciones de cultivo, composición y concentración de los componentes del medio, así como la iluminación, además de otros factores.

#### 2.2.3.4 Cultivo de ascúculas

El uso de ascúculas como inóculos, puede convertirse en una de las actividades preferidas por los investigadores hablando en términos de propagación clonal, ya que se estaría multiplicando el genotipo del árbol parental y no como ocurre en los embriones que en la mayoría de los casos provienen de polinización abierta, excepto cuando se trabaje - con material de polinización controlada.

Jansson y Bornman (1980) logran la formación de yemas adventicias en un 22 % de las ascúculas, con adición de 5 micromoles de BA y 50 nanomoles de ANA, su desarrollo a brotes se hizo por la transferencia al medio libre de reguladores y a un tercio de su concentración original de los -- componentes del medio básico; los inóculos empleados fueron obtenidos de plántulas de 20 a 22 días de Picea abies, las cuáles fueron consideradas de un año debido a un tratamiento de congelación.

Jansson y Bornman (1981) observaron que la iniciación de yemas en ascúculas en la misma especie, es gradualmente afectada por la edad en función de su longitud, así las -- ascúculas de 5 mm produjeron yemas sobre toda su superfi-

cie, las de 10 mm en la porción proximal e inmediatamente distal a la zona de abscisión. Las yemas originadas en la zona proximal a la abscisión, se iniciaron en las células epidermales y de las células subsidiarias de los estómas, mientras que las originadas en la parte distal solo en células epidermales.

Usando segmentos de ascículas primarias de Pinus radiata de 10 a 12 semanas de edad Reilly y Brown (1976) lograron la formación de callo que posteriormente transfirieron a un medio a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento, donde ocurrió la formación de pequeños meristemas apicales, que pudieron ser inducidos a formar brotes cuando se cortaron y transfirieron a medio fresco y libre de reguladores de crecimiento.

Inóculos provenientes de árboles juveniles de tres especies de pinos mexicanos (Pinus patula, P. cembroides y P. pseudostrobus) Barrientos (1983) sembró las ascículas que se tomaron de ramas jóvenes en diferentes medios variando las concentraciones de BA y ANA, logró la formación de callo sin comunicar organogénesis.

#### 2.2.3.5 Cultivo de brotes apicales y axilares

Los cultivos de yemas apicales así como los brotes axilares se enfocan en la propagación de árboles maduros los que han expresado su potencial genético y que pueden ser seleccionados para la propagación. Arnold y Eriksson (1979) lograron formar yemas adventicias sobre la punta de yemas vegetativas de Picea abies colectadas de árboles de 5 a 50 años sin encontrar correlación entre la capacidad de formación de yemas y la edad del árbol paren-

tal, además los estudios anatómicos mostraron que las yemas se iniciaron de los primordios de ascículas y no de las yemas axilares.

Utilizando restos de yemas terminales de árboles de Pseudotsuga menziesii de 30 años de edad en presencia de BA y ANA se formaron yemas adventicias. Thompson y Zaerr (1981) determinaron que para la formación de yemas adventicias, son muy importantes la época de colecta, concentración de algunos componentes del medio, específicamente las fuentes de nitrógeno.

Mapes, et al, (1981) desarrollaron un método para el cultivo de yemas axilares de Pseudotsuga menziesii con el que encontraron que la citocinina y la auxina en el medio son prerequisite para su desarrollo, sin embargo la proliferación de las yemas, se logra cuando fueron transferidas al medio sin reguladores de crecimiento.

David (1982) menciona que los problemas por superar en el cultivo de yemas vegetativas son el rejuvenecimiento para restituir la actividad morfogénica del inóculo, y el alargamiento normal de los brotes así como su enraizado.

#### 2.2.4 Formación de raíz

Los resultados en la inducción de raíz en los brotes aislados, obtenidos por el cultivo in vitro son variados, el proceso puede dividirse en dos fases: la inducción de raíz y el sobrecrecimiento del sistema radicular generado que permita su establecimiento bajo condiciones de invernadero, vivero o campo. Las técnicas empleadas presentan diferentes modalidades y condiciones, así por ejemplo: Campbell

y Durzan (1976) observaron la formación de raíz en los brotes que fueron cortados y transferidos al medio sin reguladores; Sommer et al. (1975), mencionan que el aporte de auxina incrementa el enraizado en los brotes de Pinus palustris.

Webb y Street (1977) logran bajo condiciones no estériles enraizar el 20 % de los brotes de Pinus contorta y Picea sitchensis en atmósfera con niebla; sin embargo el porcentaje de enraizado se incrementa por la adición de - 2iP o cinetina.

La inmersión de los brotes de Pinus pinaster en una solución de un enraizador comercial durante 24 h y que posteriormente se colocaron en una mezcla esterilizada de turba/perlita, se logró el enraizado en un 60 y 90 % dependiendo del tipo de inóculo del que provienen los brotes (David, et al., 1978).

El suministro de AIB (10 micromoles) promovió el enraizado de un 5 % en brotes de Pseudotsuga menziesii (Winton y Verhagen, 1977). La formación de raíces ocurrió espontáneamente en el medio diluido; sin embargo Arnold y Eriksson (1981) aumentaron la respuesta al suministrar AIB en el medio de cultivo.

Vargas (1982) logró la inducción de raíz en brotes individuales de Pinus patula, colocados en el medio básico, con su concentración original, pero con reducción de sacarosa al 1 % y con adición de ANA y AIB. El tamaño de los brotes fue considerado por Mehra, et al., (1977) ya que observaron ~~que~~ para enraizar los brotes de Pinus taeda deberían tener un tallo de 5 mm de longitud.



La formación de raíces en gimnospermas ha sido estudiada poco, solo se han logrado formarlas en brotes derivados de embriones, o de estructuras de plantas de pocos días o años y solo en determinadas especies. El porcentaje de enraizado suele ser muy bajo sin el aporte de reguladores de crecimiento, alrededor del 1 % (David, 1982).

### 2.3. Factores que intervienen en el cultivo in vitro

#### 2.3.1 Selección del inóculo

Todas las células vegetales tienen la aptitud potencial de dividirse y crear un nuevo individuo completo y semejante al que se le tomó la muestra, a ésta capacidad se le conoce como totipotencialidad celular, en la actualidad es difícil demostrar en forma general, solo se ha logrado bajo condiciones muy precisas y en cierto grupo de plantas. Por lo tanto resulta importante y conveniente la selección de un grupo de células a usar como inóculo, para que sean capaces de reaccionar bajo las condiciones de cultivo y permitir así la multiplicación vegetativa (Vidalie, et al, 1986).

Dependiendo de la edad y la etapa fisiológica de la planta madre, el inóculo puede variar sus respuestas en gran medida, ya que las plantas jóvenes disminuyen su potencialidad con la edad o incluso por su posición de un mismo árbol (ver figura 5) como lo expone Bonga (1982).

Los embriones como las estructuras embrionarias han demostrado su potencialidad como inóculos como lo demuestran los trabajos de Cheng, 1976; Arnold y Eriksson, 1978 y 1981; Vargas, 1982; Ellis y Bilderback, 1984 entre otros. El -

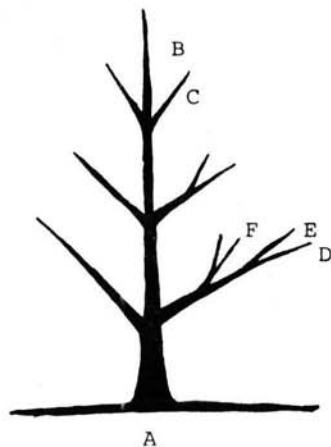


Figura 5. Gradiente de juvenilidad en coníferas. El grado de juvenilidad de un meristemo apical es inversamente proporcional a la distancia entre la unión del brote A y el meristemo. Así  $AB > AD > AE > AF$  siendo B el meristemo más maduro y F el más juvenil. Tomado de Bonga (1982).

uso de los cotiledones es para Vidalie, et al., (1986) la mejor vía para afinar las condiciones nutrimentales para el uso de inóculos de mayor edad. Aunque en embriones falta mucho por hacer sobre todo por la diversidad en los resultados obtenidos por muchos investigadores, incluso trabajando con la misma especie.

### 2.3.2. Época de colecta del inóculo

En las coníferas se observan dos etapas una activa y otra en que disminuyen las funciones matabólicas. Durante éstas etapas las reacciones a menudo son diferentes durante el ciclo anual en el cual cambian los equilibrios internos de la planta, aumentando la presencia de auxinas y citoquininas así como de giberelinas durante la primavera, en el verano disminuyen; en el otoño se detectan los primeros inhibidores y en el invierno la mayoría de los centros de crecimiento entran en dormancia. Por lo tanto la época de colecta debe determinar las diferentes reacciones del inóculo bajo las condiciones del cultivo in vitro (John, 1983).

En los trabajos de propagación por estacas se observa claramente la influencia de la época de colecta como lo señalan Whitehill y Schwabe (1975). En el cultivo in vitro se puede observar el mismo comportamiento por ejemplo Arnold y Eriksson (1979) no encontraron diferencias en el cultivo de yemas de Picea abies colectadas entre los meses de septiembre a mayo, pero mencionan que nunca se observó la formación de yemas adventicias en las colectadas en verano. Vidalie, et al., (1986) expone que éste obstáculo se puede librar, aplicando tratamiento en frío a las plantas madre, por iluminación especial y por el uso de reguladores, tratando

de cambiar los niveles de los reguladores internos de los inóculos.

Patiño (1973), Eguiluz (1978) y Niembro (1986), mencionan las épocas de colecta de los conos de varias especies de pinos mexicanos. En el caso del uso de embriones como inóculos es importante contar con semilla que garantice la madurez del embrión y por lo tanto su viabilidad para su establecimiento in vitro.

### 2.3.3 Tamaño del inóculo

Con respecto al tamaño del inóculo, cuanto mayor sea más determinantes serán los equilibrios endógenos, por lo tanto el efecto de los reguladores exógenos, incluidos en el medio de cultivo serán limitados; en contraste un inóculo pequeño será afectado con mayor facilidad por las sustancias en el medio, como lo pueden ser los reguladores de crecimiento (Vidalie, et al, 1986).

### 2.3.4. Asepsia del inóculo

Lograr la asepsia total del inóculo es determinante en el éxito del cultivo, además el proceso no debe dañar la viabilidad del inóculo. Los cultivos continuamente están expuestos a la invasión de microorganismos, los cuales proliferan más rápidamente y terminan invadiendo al inóculo. Algunos de los agentes químicos más ampliamente usados para lograr la asépsia de los inóculos son los siguientes:

Hipoclorito de calcio	(4%)
Hipoclorito de sodio	(1 a 2%)
Cloruro de mercurio	(40 a 50%)
Peróxido de hidrógeno	(40 a 50%)

Algunos agentes físicos también son usados en la técnica de cultivo in vitro sin embargo no se aplican directamente sobre los inóculos, solo evitan la presencia de los microorganismos ambientales durante la manipulación y siembra, entre los que se encuentran: los sistemas de filtración, rayos ultravioleta, flama de mechero y temperaturas arriba de 120°C. Generalmente se deben determinar las condiciones óptimas para cada tipo de inóculo, la duración, concentración, combinación de agentes (Narayanaswamy, 1977; Vidalie, et al., 1986).

#### 2.3.5. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es importante en el establecimiento del inóculo in vitro. Cada tipo de tejido requiere una formulación diferente, dependiendo del objetivo que se persiga. Los medios de cultivo están constituidos por un balance de macronutrientes requeridos en grandes cantidades por las plantas como el calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fósforo y azufre; otros nutrientes son requeridos en pequeñas cantidades, los micronutrientes como: hierro, molibdeno, boro, cobre, cinc, manganeso, cloro, níquel, aluminio entre otros. El hierro es un elemento esencial mientras que los otros son adicionados como medida de precaución ya que se desconoce o se sabe muy poco de su influencia en el crecimiento de los tejidos (Vidalie, et al., 1986).

En el cultivo in vitro los tejidos también requieren de sustancias orgánicas para su crecimiento, como fuente de

carbono se usa comunmente la sacarosa aunque también se han empleado otras como la glucosa. Las vitaminas que se añaden a los medios pertenecen al complejo B y de éstas la tiamina es esencial, otras son la piridoxina, ácido nicotínico y el mio-inositol, ésta última mejora el crecimiento de los tejidos pero no parece esencial. Los aminoácidos son el otro grupo de sustancias orgánicas que algunos tejidos o células de cierta especie requieren, a veces se agregan como caseína hidrolizada o bien se agregan los isómeros -L de asparagina, glutamina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina solos o combinados (Narayanaswamy, 1977 y Vidalié, *et al.*, 1986).

Algunos productos naturales complejos suelen agregarse con la finalidad de enriquecer el medio de cultivo o favorecen una determinada respuesta en el inóculo, algunos de éstos son: agua de coco, jugo de tomate, de naranja y otros extractos de plantas así como levaduras (Narayanaswamy, 1977).

La función primaria del mayor número de los componentes del medio es nutrimental, es decir suministran energía o sirven de materia prima para construcción de otras moléculas esenciales para las células de las plantas. Sin embargo el agar es un agente solidificante más común en los medios y éste participa más físicamente que químicamente. Aunque Bonga (1982) menciona que el agar es una fuente de muchos minerales particularmente de sodio y posiblemente de algunas vitaminas y toxinas que pueden complicar los estudios metabólicos y nutrimentales además cita que puede ser benéfico porque tiene capacidad de absorción y puede remover algunos productos de desecho celular como el carbón activado; se puede esperar diferencias en la respuesta de crecimiento de los cultivos dependiendo del grado de pureza del agar.

Cuadro 1. Composición química de algunos medios empleados en el cultivo in vitro en coníferas ( $\text{mgL}^{-1}$ ).

COMPUESTO	Murashige y Skoog (1962)	Schenk y Hildebrandt (1972)	Gresshof y Doy (1972)	Arnold y Eriksson (1977)	Lloyd y McCown (1980)	Borrmann (1981)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	400
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	300	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	1200	400	-
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	1000	1900	-	2000
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	556	500
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	-	90	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	30	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-	340	170	270
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	400	250	370	370	250
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	10	10	22	16.6	0.17
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	1	3	-	8.6	3
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.2	0.25	0.0025	0.25	0.025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.85	15	27.85	14	27.8	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	990	-
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	200	150	180	96	-
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.25	0.0025	-	0.025
KCl	-	-	300	-	-	300
KI	0.83	1	0.75	0.78	-	0.25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	5	3	0.63	6.2	1.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.1	0.25	0.025	0.25	0.25
NaFe <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	37.5
Na <sub>2</sub> · EDTA	37.25	20	37.25	19	37.3	-
Zn · EDTA	-	-	-	4.5	-	-

-CONTINUA-

COMPUESTO	Murashige y Skoog (1962)	Schenk y Hildebrandt (1972)	Gresshof y Doy (1972)	Arnold y Eriksson (1977)	Lloyd y McCown (1980)	Bornman (1981)
Mio-inositol	100	100	10	100	100	90
Tiamina.HCl	0.1	5	1	5	1	1.7
Acido nicotínico	0.5	0.5	0.1	2	0.5	0.6
Piridoxina.HCl	0.1	0.5	0.1	1	1	1.2
Pantotenato de						
Calcio	-	-	-	-	-	0.5
Biotina	-	-	-	-	-	0.125
Glicina	2	-	-	2	2	2
Vitamina B12	-	-	-	4.5	-	-
Acido fólico	-	-	-	-	990	1.1

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. *Physiol. Plantarum*. 15:473-479.

Schenk, R. W. y A. C. Hildebrandt. 1972. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

Gresshof, P. M. y C. H. Doy. 1972. *Planta*. 107:161-170.

Arnold, S. von y T. Eriksson. 1977. *Physiol. Plant.* 39:257-260.

Lloyd, G. B. y B. H. McCown. 1980. *Proceeding if the International Plant Propagation Society*. 30:421-427.

Bornman, C. H. 1981. *Symposium on Clonal Forestry. Sweden*. pp.43-56.



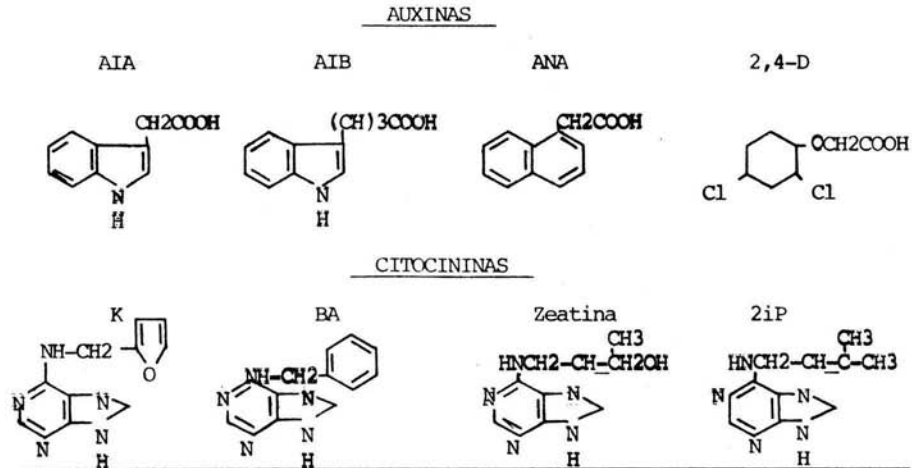
Algunos investigadores han desarrollado medios que se ajustan más a los requerimientos de las coníferas como son: Rancillac, et al. (1980), Lloyd y McCown (1980), Bornman (1983) y Gupta y Durzan (1985). Pero la generalización a todas las especies de alguno de los medios no es posible (ver cuadro 1).

### 2.3.6 Reguladores de crecimiento

Las auxinas fueron los primeros reguladores de crecimiento descubiertas en 1934 y hacia los cincuenta las giberelinas y las citocininas y el ácido abscísico en los sesenta. Las sustancias empleadas como reguladores de crecimiento se pueden considerar de naturaleza endógena (si son sintetizadas por el propio vegetal), o exógena (sintetizadas por el hombre), Vidalie, et al. (1986), (ver figura 6).

Los reguladores de crecimiento presentan características que le son comunes: actúan en concentraciones bajas, pues en altas resultan tóxicos; solo interactúan con otros reguladores; intervienen en muchos procesos fisiológicos, es decir no son específicos; los reguladores endógenos son metabolizados por la maquinaria celular y son controlados rápidamente o eliminados mientras que los exógenos actúan durante más tiempo. De los reguladores más importantes en el cultivo in vitro (auxinas y citocininas) aunque no se puede dar una respuesta precisa respecto a la forma en que actúan, sin embargo algunos investigadores mencionan la presencia de ciertos receptores auxínicos en el citoplasma o en las membranas pero hasta ahora se consideran como una hipótesis (Vidalie, et al., 1986).

Figura 6. Auxinas y citocininas más empleadas en el cultivo in vitro.



AIA: Acido indolacético  
 AIB: Acido indolbutírico  
 ANA: Acido naftalenacético  
 2,4-D: Acido 2,4-diclorofenoxiacético

K: Cinetina o 6 furfúril-amino  
 purina  
 BA: Bencil adenina  
 2iP: Isopentil adenina

Con respecto a la acción de las citocininas Zaerr y Mapes (1982) mencionan que actúan directamente sobre las enzimas, controlando más la acción de éstas que la síntesis. La expresión de la actividad de las citocininas es influenciada por las variaciones estructurales, por la configuración espacial, así como el tipo de átomos en el nitrógeno (N-6).

La aplicación de los reguladores de crecimiento en el cultivo in vitro es determinante, en el campo forestal desafortunadamente son pocos los trabajos que han tratado el mecanismo de acción, la determinación de los mejores, así como sus concentraciones, se han derivado empíricamente, el campo de acción de los reguladores al ser aplicado a un número de especies puede dar resultados contradictorios Zaerr y Mapes, (1982). (Ver figura 7 ).

Zaerr y Mapes (1982) mencionan que la proporción de auxinas/citocininas, usualmente controlan la dirección morfogénica, pero no siempre, ya que algunas especies forestales han sido regeneradas por las técnicas in vitro, pero se puede observar que los procedimientos son diferentes para cada especie. El futuro del cultivo in vitro dependerá de la habilidad para establecer las condiciones propicias con respecto a los nutrimentos, a la concentración de los reguladores así como al tiempo de exposición para obtener la respuesta deseada. Los principales reguladores empleados en el cultivo in vitro son:

- .Auxinas
- .Citocininas
- .Giberalinas

Auxinas. Las auxinas más ampliamente usadas en el cultivo in vitro se muestra en la figura 7, sin embargo en las

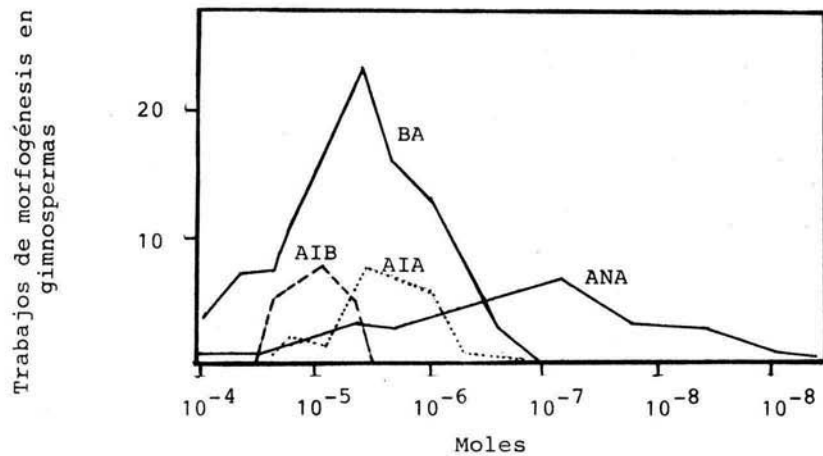


Figura 7. Relación entre los trabajos que han obtenido morfogénesis satisfactoria en coníferas con la concentración molar de los reguladores de crecimiento (Datos tomados hasta 1980). Tomado de Durzan(1982).

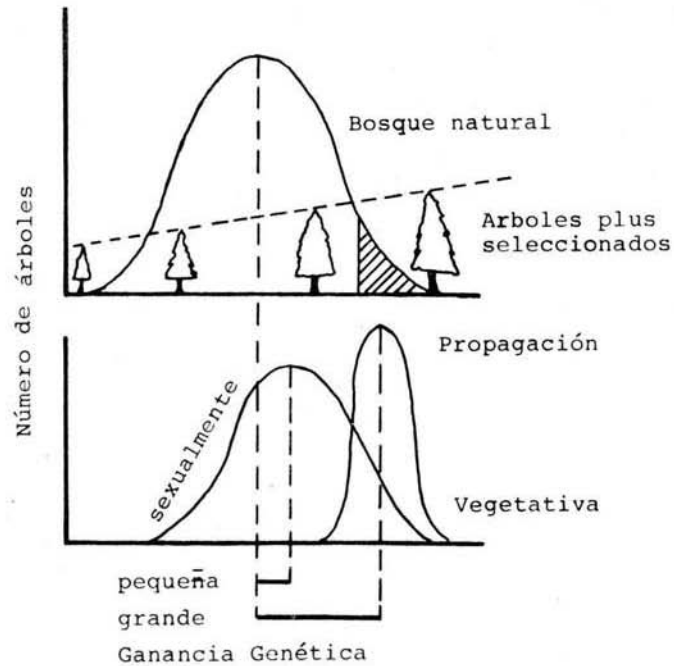


Figura 8. Comparación de las ganancias genéticas obtenidas con la propagación sexual y vegetativa de árboles plus seleccionados. Tomado de Bonga (1982).

especies forestales se han empleado otros como: el ácido indolpropiónico (AIP); el ácido naftoacético (ANO); el ácido 2,3,6-triclorobenzoico y el ácido 2-benzotiozol-oxiacético (Zaerr y Mapes, 1982; Vidalie, et al, 1986).

Los efectos de las auxinas son variados, puesto que intervienen en numerosos fenómenos fisiológicos entre ellos:

- . Crecimiento celular (alargamiento celular).
- . Modificación de la permeabilidad de la membrana celular.
- . Estimula la división celular, que conduce a la formación de callo, efecto calificado de " histógeno ".
- . En la síntesis de etileno, el cual regula las concentraciones de auxinas, al menos a nivel de transporte.
- . Retardan la caída de hojas y frutos.
- . Acción rizógena (Zaerr y Mapes, 1982; Vidalie, et al, 1986).

Citocininas. Son los reguladores más importantes junto con las auxinas, ya que han permitido grandes adelantos en la propagación vegetativa, sus principales efectos son:

- . Incremento en la división celular que está en función de la proporción auxina/citocinina.
- . Participación en el proceso organogénico, antagónico al rizogénico.
- . Como estimulantes del metabolismo, aumentando la síntesis proteica y proteger a los metabolitos de la acción de las enzimas hidrolíticas produciendo un retraso en la senescencia.
- . Efecto ontogénico de la dominancia apical.

En el cultivo in vitro de árboles, la mejor de las cito<sub>cininas</sub>, es el BA considerada altamente efectiva, de carácter exógeno, empleada en la inducción de callo y principalmente en la inducción de brotes. Se le ha empleado en la inducción de raíz. La aplicación de BA que suele combinarse con bajas concentraciones de auxina, lo que conduce a suponer que la dirección de la morfogénesis está determinada críticamente por la concentración empleada de los reguladores (Zaerr y Mapes, 1982 y Vidalie, et al., 1986).

Giberalinas. El ácido giberélico fue el primero en ser identificado y actualmente se conocen más de 50; en la práctica las utilizadas son GA<sub>3</sub> o ácido giberélico, el GA<sub>7</sub> y la mezcla de GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub>. Los principales efectos observados son:

- . Alargamiento de los entrenudos.
- . Activación de meristemas.
- . Son estimulantes del metabolismo, favorecen la síntesis de enzimas hidrolíticas.
- . En la floración tienen una acción compleja.
- . En el desarrollo de los frutos.
- . En la liberación de la dormancia.
- . En la organogénesis muestra acciones antagónicas que parecen oponerse a la diferenciación.

En el campo forestal, los efectos de las giberalinas son poco claros o no han sido observados, por lo que no hacen necesario el suministro de niveles exógenos (Zaerr y Mapes, 1982 y Vidalie, et al., 1986).

### 2.3.7 Condiciones de cultivo

El metabolismo de los tejidos del inóculo, se pueden modificar por completo si se establecen en el medio líquido o sólido; en éste último la concentración de agar o agente solidificante y su calidad puede tener efectos claros en función del tipo del inóculo y del pH al que se ajuste el medio. En los medios líquidos, la velocidad de agitación debe considerarse, el intercambio gaseoso raramente es estimado. El pH es un factor crítico y generalmente se ajusta entre 5.5 a 5.8, aunque debe tomarse en cuenta que disminuye con el transcurso del tiempo de cultivo (Narayanawamy, 1979 y Vidalie, et al., 1986 ).

Los principales factores del medio ambiente son la luz y la temperatura, con respecto a la luz hay que considerar la intensidad luminosa (comunmente de 10 a 15 W/m<sup>2</sup>), la duración de la iluminación ( 16 a 18 h/día ) y la calidad espectral recibida, generalmente proporcionada por tubos de luz fluorescente blanca; aunque algunas veces se complementa con lámparas incandescentes. Existen trabajos que demuestran que ciertas longitudes de onda, pueden activar ciertos fitocromos y que éstos pueden inducir respuestas morfognéticas. La temperatura se establece entre los 22 a 25 °C, pero debe tomarse en cuenta si la especie es de clima templado o tropical, por lo que entónces se recomientan temperaturas de 20 a 25 °C  $\pm$  1 °C, respectivamente ( Bonga, 1982 y Vidalie, et al., 1986 ).

### 2.4 Aplicación del cultivo in vitro de árboles

El desarrollo de las técnicas de cultivo in vitro en el campo forestal ha abierto un sin numero de áreas de aplicación que fomentan y abren nuevas alternativas del conoci-



miento, que permitirán el óptimo aprovechamiento de los recursos forestales. A continuación se dan algunas áreas donde la aplicación del cultivo in vitro es evidente:

- . En trabajos de investigación básica relacionadas con fisiología, bioquímica, genética, biología celular, ...etc.
  - . En el mejoramiento de las especies forestales más importantes por medio de la propagación de árboles plus o élite, para el establecimiento de huertos semilleros o plantaciones comerciales. (Ver figura 8 y 9).
  - . En la formación de híbridos somáticos de tipo homocigótico o heterocigótico. ( Ver figura 10).
  - . Para obtener líneas homocigóticas para programas de cruza específicas de genotipos conocidos.
  - . En la obtención de árboles libres de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus.
  - . Para el estudio y determinación de las relaciones entre huésped/parásito o bien relaciones simbióticas.
  - . Obtención de árboles resistentes a plagas, enfermedades, heladas, sequía o salinidad.
  - . Para el almacenamiento de recursos genéticos, por medio del establecimiento de bancos genéticos in vitro.
  - . En la introducción de genes o segmentos de éstos mediante recombinaciones génicas, por ejemplo: la introducción de material genético de Rhizobium a las especies forestales, para incrementar la eficiencia en la asimilación y fijación de nitrógeno, lo que repercutiría directamente en la producción.
  - . Incrementando la variabilidad genética por inducción de mutaciones.
  - . Para la obtención de productos de síntesis para la industria farmacéutica entre otras.
- (Durzan y Campbell, 1974; Bonga, 1977; Bonga y Durzan, 1982; John, 1983).

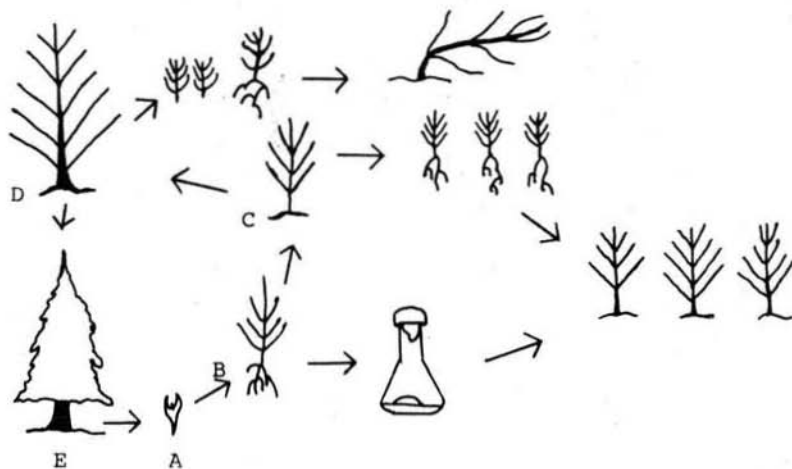


Figura 9. Ciclo de propagación vegetativa para muchas coníferas. (A) Embrión; (B) Plántula germinada; (C) Plántulas jóvenes; (D) Arboles jóvenes; (E) Arboles maduros. Tomado de Bonga (1982).

El potencial del cultivo in vitro está establecido y su futuro dependerá de la intensificación de las investigaciones, afinando muchas técnicas y generando otras, lo que sin duda repercutirá en la ampliación de los conocimientos.

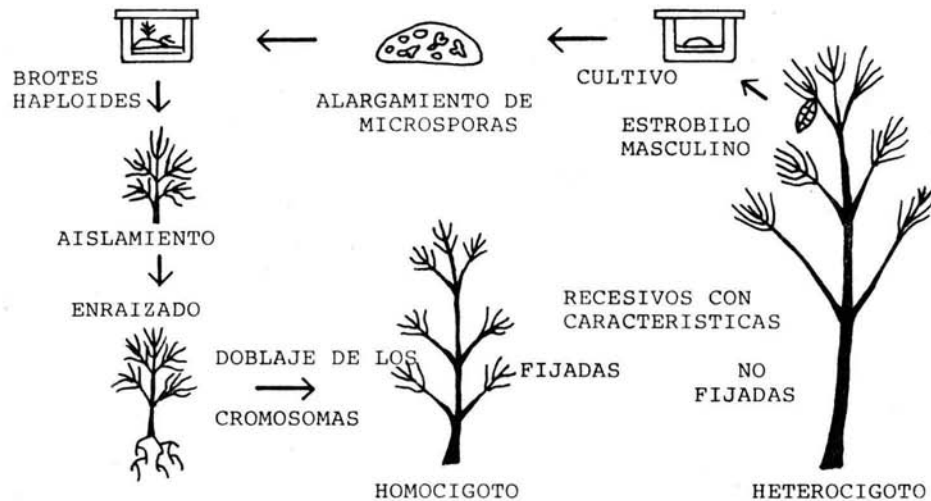


Figura 10. Regeneración de árboles homocigóticos diploides de plantas haploides regeneradas a partir de microsporas obtenidos del cultivo del gametofito masculino. Tomado de Winton y Huhtinen (1976).

### 3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de embriogénesis de Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados.

Se empleó semilla de polinización abierta de pino piñonero (Pinus cembroides Zucc.), proporcionada por la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo, que fue colectada en la localidad de San Juanito de Solís, del municipio de Zaragoza del estado de Nuevo León.

#### 3.1 Establecimiento del inóculo

##### 3.1.1 Disección del inóculo

La extracción de los embriones fue hecha de la manera siguiente: las semillas fueron lavadas con agua potable y detergente, posteriormente se enjuagaron hasta eliminar los residuos del detergente, usando agua potable, seguido por un enjuague con agua destilada.

La semilla se desinfectó, por inmersión en una solución de cloruro de mercurio al 0.1 % (p/v) durante 5 min, enjuagadas 2 a 3 veces con agua destilada. Posteriormente la semilla se colocó en un pequeño volumen de agua destilada durante 24 h, con la finalidad de hidratarla y para reblandecer la teca.

Finalmente se volvieron a sumergir en alcohol al 70 % (v/v) durante 1 min, seguido por la inmersión en cloruro de mercurio (0.1 %) durante 5 min y se enjuagaron de 2 a 3 con agua destilada esterilizada (Vargas, 1982).

La disección de los embriones fue hecha bajo una campana de flujo laminar y fueron colocados horizontalmente sobre el medio de cultivo (20 ml) contenido en frascos de vidrio de boca ancha (50x75 mm), se colocaron 3 embriones por frasco haciendo un total de 15 embriones por cada tratamiento.

Los frascos con los embriones fueron marcados para su identificación y se colocaron en un cuarto de incubación, iluminados con una intensidad de 3000 lux ( $15 \text{ W/m}^2$ ) proporcionada por lámparas de luz blanca fluorescente en forma con tínua y la temperatura fue mantenida a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.1.2 Medio de cultivo

Para el desarrollo de éste trabajo se emplearon los medios básicos desarrollados por Schenk y Hildebrandt (1972) denominado SH, que ha sido usado ampliamente para el rápido crecimiento de callo de angiospermas, pero que también se ha empleado en el cultivo in vitro de gimnospermas (Reilly y Washer, 1977; Barrientos, 1983) por lo que fue seleccionado para observar la respuesta de los embriones de la especie en estudio. El segundo medio básico empleado fue el denominado DCR desarrollado por Gupta y Durzan (1985), que ha sido usado para la multiplicación de brotes de tejidos maduros de coníferas, empleado en éste trabajo para probar su efecto en los embriones de la especie citada. De ésta manera se determinará cuál de los dos medios favorece más la formación de brotes y así emplearlo en futuros ensayos. En el cuadro 2 se da la com posición y en los anexos 1 y 2 la preparación de las solucio nes concentradas y su mezcla.

La esterilización de los medios de cultivo se hizo en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  y a  $1.14 \text{ Kg cm}^{-2}$  de presión durante 20 min,

Cuadro 2. Medios empleados en el cultivo in vitro de embriones de Pinus cembroides Zucc. (Schenk y Hildebrand, SH (1972) y Gupta y Durzan, DCR (1985)).

COMPONENTE	MEDIO SH mg L <sup>-1</sup>	MEDIO DCR mg L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	2500	340
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	400
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	556
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400	370
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200	85
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	22.3
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	8.6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2	0.25
KI	1	0.83
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	20	37.3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2	0.025
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	0.025
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2	0.25
Glicina	-	2
Mio-inositol	10	200
Tiamina.HCl	5	1
Piridoxina.HCl	0.5	0.5
Ac. nicotínico	5	0.5
Sacarosa	30000	30000
Agar	7500	7500

el pH fué ajustado a 5.8 con NaOH y HCl 0.1 N. La sacarosa fué agregada a la concentración de  $30 \text{ gL}^{-1}$  y la cantidad de agar fué de  $7.5 \text{ gL}^{-1}$  para el medio SH y de  $6.0 \text{ gL}^{-1}$  para el medio DCR.

### 3.1.3 Reguladores de crecimiento

Los medios de cultivo fueron suplementados con diferentes combinaciones de ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) en concentraciones que se dan en el cuadro 3 para el medio SH y en el cuadro 4 para el DCR.

### 3.2 Multiplicación del inóculo

Los embriones fueron transferidos a medio fresco cada 4 ó 5 semanas. Cuando las yemas adventicias completaron su desarrollo a brotes (tallos, hojas primarias y meristemo apical bien diferenciados) fueron disectados del embrión y se colocaron en los medios básicos al 100% de su concentración pero sin reguladores de crecimiento (Campbell y Durzan, 1976) y se redujó la concentración de sacarosa a 20 y  $10 \text{ gL}^{-1}$  con la finalidad de obtener el alargamiento de los brotes (Vargas, 1982). Otra forma de lograrlo fue transfiriendo al embrión completo a las condiciones anteriores para que los brotes más pequeños crecieran y pudieran disectarse sin dañarlos.

### 3.3 Enraizamiento in vitro

En los ensayos de inducción de raíz solo se emplearon brotes bien diferenciados mayores a 0.5 cm según Mehra, et al. (1977). Para cada ensayo se utilizaron 15 brotes por



Cuadro 3. Combinaciones de ANA Y BA establecidas para inducir brotes adventicios en el medio SH.

		Concentración molar*				
ANA	BA	0.0	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$
	0.0	1	2	3	4	5
*	$10^{-7}$	6	7	8	9	10
	$10^{-6}$	11	12	13	14	15
	$10^{-5}$	16	17	18	19	20
	$10^{-4}$	21	22	23	24	25

Cuadro 4. Combinaciones de ANA y BA establecidas para inducir brotes adventicios en el medio DCR.

Concentración molar *					
BA	0.0	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$
ANA					
0.0	1	2	3	4	5
$10^{-7}$	6	7	8	9	10

tratamiento, excepto cuando se indique lo contrario.

### 3.3.1 Reducción de la concentración del medio y sacarosa

Los brotes al alcanzar el tamaño establecido (0.5 cm mínimo) se transfirieron al medio SH al 50 % de su concentración y la sacarosa se redujo de 30 g L<sup>-1</sup> a 20 y 10 g L<sup>-1</sup> con carbón activado haciendo un total de cuatro tratamientos que se dan en el cuadro 5. Finalmente se colocaron en el cuarto de incubación bajo las condiciones de inducción.

TRATAMIENTO NUMERO	CONCENTRACION		
	DEL MEDIO	DE SACAROSA	DE CARBON
	%	g L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>
1	50	10	1.0
2	50	10	2.0
3	50	20	1.0
4	50	20	2.0

Cuadro 5. Reducción del medio básico SH al 50% de sacarosa y con carbón activado para inducir raíz.

### 3.3.2 Aplicación de enraizador en polvo

Se colocaron 2 g del enraizador en un vaso de precipitados que fue sellado perfectamente y esterilizado en autoclave durante 15 min (121 °C y 1.14 Kg cm<sup>-2</sup>). Después en la campana de flujo laminar se seccionaron los brotes de los

embriones y se introdujo su base en el enraizador (10 000 ppm de AIB y 300 ppm de ANA), posteriormente se dió una pequeña sacudida para eliminar el exceso de enraizador y se colocaron en el medio SH al 50% de su concentración, con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa y  $2 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado y se mantuvieron bajo las condiciones del cuarto de incubación.

### 3.3.3 Aplicación de enraizador líquido

Después de cortar los brotes directamente del inóculo se sumergieron sus bases en el enraizador líquido "Radix" (10 000 mg de AIB y 30 mg de ANA por 100 ml de enraizador), durante diferentes tiempos: 5, 10 y 15 min ; posteriormente se transfirieron al medio SH al 50% con  $20 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa y  $2 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado. La esterilización del enraizador se efectuó por filtración a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0.45 micrómetros y los brotes se colocaron bajo las condiciones del cuarto de incubación.

### 3.3.4 Tratamientos de ANA y AIB

Se probaron 20 tratamientos de ANA y AIB adicionados solos o combinados al medio SH con  $10 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa y  $2 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado, en el cuadro 6 se muestran las combinaciones de auxinas. Los brotes se mantuvieron en los tratamientos durante cuatro semanas y posteriormente el 50% de ellos se transfirieron al mismo medio pero sin las auxinas y el otro 50% se utilizó para efectuar un ensayo extra in vitro.

Cuadro 6. Tratamientos de ANA y AIB para inducir raíz a brotes de Pinus cembroides Zucc.

		CONCENTRACION ( mg L <sup>-1</sup> ) *				
AIB		0.0	0.01	0.05	0.1	1.0
ANA						
	0.0	1	2	3	4	5
	0.01	6	7	8	9	10
*	0.05	11	12	13	14	15
	0.1	16	17	18	19	20

### 3.3.5 Adición de enraizador líquido al medio de cultivo

En éste ensayo se utilizó el medio DCR al 50% de su concentración al que se le suministró directamente diferentes cantidades de enraizador líquido (Radix), ver cuadro 7. Se empleó una concentración de sacarosa de 5 g L<sup>-1</sup>, la de agar de 6 g L<sup>-1</sup> y con carbón activado 1 g L<sup>-1</sup>; los brotes fueron mantenidos en éste medio durante 4 semanas y posteriormente se transfirieron al mismo medio pero sin el enraizador.

Cuadro 7. Tratamientos con "Radix" adicionado al medio DCR.

TRATAMIENTO NUMERO	CANTIDAD DE RADIX (ml)	CONCENTRACION (mg L <sup>-1</sup> )	
		AIB	ANA
1	10	1000	3
2	5	500	1.5
3	1	100	0.3
4	0.5	50	0.15
5	0.1	10	0.03

### 3.3.6 Combinación de auxinas con BA y variación de sacarosa con AIB

Se utilizó el medio DCR al 50% de su concentración con  $6 \text{ gL}^{-1}$  de agar y  $2 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado. Las auxinas empleadas fueron el AIB ( $1.0$  y  $5.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) y el ANA ( $0.05, 0.1$  y  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) que se combinaron con  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y con  $5 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa. También se ensayaron diferentes concentraciones de sacarosa ( $60, 30, 20$  y  $5 \text{ gL}^{-1}$ ) con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB, ver cuadro 8.

### 3.3.7 Transferencia al medio DCR sin reguladores

Los brotes cortados se transfirieron al medio DCR al 100% de su concentración con  $5 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa y  $6 \text{ gL}^{-1}$  de agar, en éste ensayo se prueba el efecto del medio para inducir raíces de manera espontánea y tener un testigo.

## 3.4 Enraizamiento extra in vitro

### 3.4.1 Transferencia de brotes a una mezcla de tierra de monte/agrolita

Después de cortar los brotes de los inóculos se sumergieron sus bases en el enraizador líquido durante 2 min, posteriormente se colocaron en macetas que contienen la mezcla de tierra de monte/agrolita en proporción de 2:1 (v/v), que fue esterilizada previamente en la auto clave (15 min). Los brotes ya en las macetas se cubrieron con bolsas de plástico sujetas con ligas; para evitar

Cuadro 8. Combinación de auxinas (AIB y ANA) con BA y variación de la concentración de sacarosa con AIB para inducir raíz a los brotes de Pinus cembroides Zucc.obtenidos in vitro.

TRATAMIENTO (número)	AIB	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BA	SACAROSA (g L <sup>-1</sup> )
1	1	0.05	1	5
2	1	0.1	1	5
3	1	0.5	1	5
4	1	1	1	5
5	5	0.05	-	5
6	5	0.1	-	5
7	10	-	-	60
8	10	-	-	30
9	10	-	-	20
10	10	-	-	5

la evaporación excesiva que pudiera dañar al brote, los riegos se realizaron dos veces por semana con agua potable con  $1 \text{ g L}^{-1}$  de un fungicida (Captan). Las condiciones de temperatura e iluminación fueron las del cuarto de incubación.

#### 3.4.2 Transferencia a la mezcla de tierra/agrolita después de un tratamiento con ANA y AIB.

El 50% de los brotes empleados en el punto 3.3.4 fueron transferidos a macetas con tierra de monte y agrolita sin la aplicación de enraizador en las bases de los brotes, eliminando los residuos de agar con agua destilada colocándolos y cubriéndolos como en el punto anterior.

#### 3.5 Toma de datos

Se tomaron diferentes datos durante el desarrollo del presente trabajo, dependiendo de la respuesta obtenida en los inóculos.

Las observaciones se efectuaron semanalmente, en la primera se separaron los frascos que mostraron invasión de microorganismos, los cuales fueron eliminados y reemplazados para mantener constante el número de embriones por tratamiento. Se tomó nota de los cambios observados en los embriones con la finalidad de integrar y descubrir las respuestas en cada tratamiento.

La toma de datos numéricos se efectuó hasta la primera transferencia de acuerdo a los parámetros siguientes :



- . Número de embriones que formaron callo, también se determinó el tipo de callo en base al color, textura y crecimiento.
- . Se contabilizó los brotes bien diferenciados registrando:
  - El número de brotes por embrión
  - Número máximo de brotes por embrión en cada tratamiento.
  - Promedio de brotes por tratamiento en base al número de embriones que formaron brotes.
  - Tiempo de formación de los brotes.
  - Tamaño de los brotes a las 16 semanas de iniciado el cultivo en el medio SH y a 10 semanas en el DCR.
  - Se tomó nota de las estructuras embrionarias donde tuvo lugar la formación de los brotes como información adicional.

### 3.5.1 Análisis estadístico

Para el análisis del experimento, constituido por 25 tratamientos determinados por la combinación de ANA y BA (ver cuadro 3), se realizó un arreglo factorial de  $5^2$  completamente al azar con 15 repeticiones en cada tratamiento. Se considero el número de brotes por tratamiento y sólo - los primeros 15 tratamientos puesto que en los restantes no se obtuvo formación de brotes en el medio SH.

El experimento se ajustó al modelo siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + E_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, 15 = t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 15 = r$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Observación del  $i$ -ésimo tratamiento y la  $j$ -ésima repetición.

$m$  = Efecto de la media.

$L_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$E_{ij}$  = Error aleatorio.

Para detectar las diferencias entre los factores de variación en el número de brotes formados, se tomó el nivel de significancia del 5%. Así para la comparación estadística entre las medias se empleó la prueba de Tukey al nivel de significancia del 5%.

Para el cálculo de la diferencia mínima significativa honesta (DMSH), se realizó por medio de la ecuación siguiente:

$$W = q_{\alpha}(t; GLE) \bar{S}_x$$

Donde:

$q_{\alpha}(t; GLE)$  = Valor de F al nivel del 5%.

$t$  = Número de tratamientos.

$GLE$  = Grados de libertad del error.

$$\bar{S}_x = \frac{CME}{r}$$

$r$

$CME$  = Cuadrado medio del error.

$r$  = Número de repeticiones.

El análisis estadístico de los 10 tratamientos con el medio DCR (ver cuadro 4), se empleó el mismo modelo ajustándolo al número de repeticiones.

#### 4 RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1 Respuestas del inóculo durante el establecimiento e inducción

###### 4.1.1 Desinfestación y medios de cultivo.

El procedimiento de desinfestación de la semilla fué efectivo en un 85% en la muestra empleada para éste trabajo. Con respecto a los medios básicos empleados (SH y DCR), en ambos se observó una respuesta favorable en el establecimiento, inducción y crecimiento de los brotes adventicios.

Los resultados son similares a los que menciona Bornman (1983), quién menciona la dificultad de generalizar la respuesta de un medio de cultivo ya que existen células y tejidos ampliamente tolerantes a un buen número de componentes de los medios. Por su parte Ellis y Bilderback (1984) al probar varios medios de cultivo obtuvieron respuestas diferentes en la formación de yemas adventicias en embriones de Pinus ponderosa. En el cultivo de embriones de Pinus patula, Vargas (1982) observó diferencias cualitativas con los medios empleados (Murashige y Skoog, 1962 y el de Gresshoff y Doy, 1975); pero hace notar que al emplear concentraciones semejantes de los reguladores, la respuesta fué muy similar en ambos medios, ésto difiere de nuestros resultados (ver cuadros 9 y 10 y las figuras 11 y 12).

Las diferentes respuestas observadas dentro de un mismo tratamiento pueden ser atribuidas a la diversidad genética de los embriones, además también a que las estructuras

Cuadro 9. Efecto de los tratamientos sobre los embriones de Pinus cembroides Zucc. cultivados en el medio SH durante la inducción de brotes adventicios.

No.	TRATAMIENTOS		No. brotes máx. por embrión *	No. brotes por embrión ( $\bar{X}$ )	Tiempo de formación **	Tamaño de los brotes min y máx ***
	ANA	BA				
1	0	0	-	-	-	-
2	0	$10^{-6}$	3	0.46	6-7	0.5 - 1.0
3	0	$10^{-5}$	4	1.06	6-7	0.2 - 0.3
4	0	$2.5 \times 10^{-5}$	9	2.46	6-7	0.3 - 0.5
5	0	$10^{-4}$	13	4.13	11-12	1.0 - 3.0
6	$10^{-7}$	0	-	-	-	-
7	$10^{-7}$	$10^{-6}$	28	5.8	6-7	0.5 - 1.0
8	$10^{-7}$	$10^{-5}$	12	4.33	6-7	0.5 - 2.5
9	$10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-5}$	5	0.6	6-7	0.3 - 0.5
10	$10^{-7}$	$10^{-4}$	3	0.33	6-7	0.5 - 1.0
11	$10^{-6}$	0	-	-	-	-
12	$10^{-6}$	$10^{-6}$	2	0.13	16	0.2 - 0.3
13	$10^{-6}$	$10^{-5}$	3	0.33	14	0.2 - 0.3
14	$10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-5}$	2	0.13	11-12	0.3 - 0.4
15	$10^{-5}$	$10^{-4}$	-	-	-	-

\* Número de brotes máximo obtenido en un embrión al ser disectados.

\*\* Tiempo en que se diferenciaron los brotes en semanas.

\*\*\* Tamaño en centímetros después de 16 semanas de iniciado el cultivo.

embrionarias estén o no en contacto con el medio de cultivo así como el estado fisiológico del embrión como exponen Ellis y Bilderback (1984).

#### 4.1.2 Efecto de los reguladores de crecimiento

Auxina. La acción de las diferentes concentraciones en que se aplico el ácido naftalenacético (ANA) en combinación con el medio SH, manifestó diferentes respuestas. En concentración de  $10^{-7}$  molar se formó un pequeño callo de color crema sobre la radícula, pero se oxidó rápidamente; en algunos embriones se observó el crecimiento de la radícula, el hipocótilo así como el alargamiento de epicótilo.

La formación del callo fue más abundante en la concentración de  $10^{-6}$  molar de ANA. El callo, que mostró un color verde claro, con oxidación en ciertas porciones durante el cultivo tuvo su origen en la zona de la radícula sin evitar que ésta creciera, aunque en menor proporción que en el tratamiento anterior, también se alargó el hipocótilo y el epicótilo.

Concentraciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  molar de ANA resultaron tóxicas, a pesar de que inicialmente se formó callo en la zona de la radícula el cuál se extendió sobre todo el embrión que terminó oxidándose.

La concentración de  $10^{-7}$  molar de ANA fue la única que se probó con el medio DCR y que mostró la formación de un pequeño callo en la zona de la radícula, mostrando al mismo tiempo alargamiento de la raíz, hipocótilo y los epicótilos no se desarrollaron en ningún embrión.

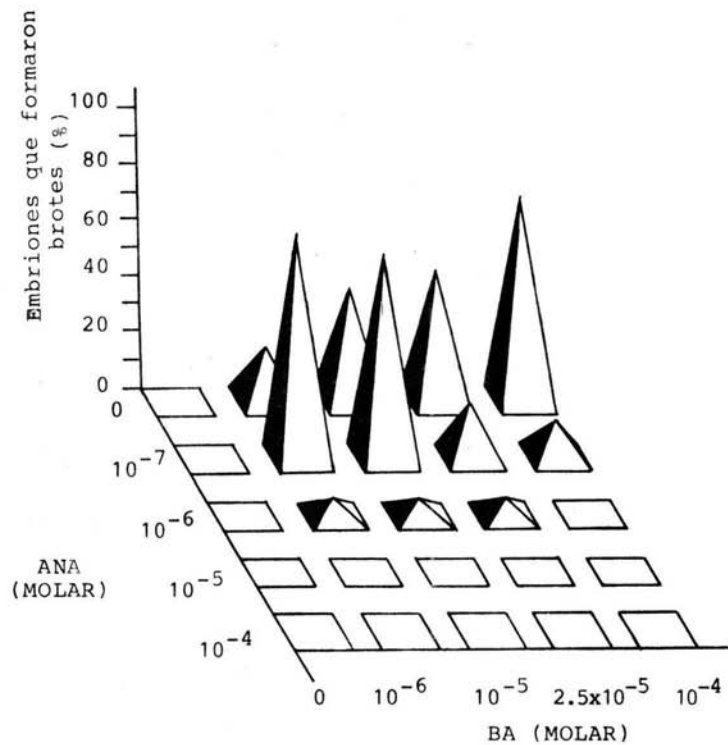


Figura 11. Efecto de las combinaciones de ANA y BA en la formación de brotes adventicios en el medio SH.

Es importante mencionar que en ninguno de los tratamientos de ANA en combinación con los medios empleados, se observó formación de yemas y por ende la formación de brotes.

La formación de tejido friable (callo) sin la formación de yemas sobre las estructuras embrionarias de Pinus strobus fue observada por Minocha (1980), además menciona que el crecimiento de la raíz embrionaria se puede suprimir con el suministro de auxinas.

La formación de callo de color café sobre la radícula en embriones de Pinus wallichiana con suministro de ANA lo mencionan Konar y Singh (1980) y Arnold y Eriksson (1978) en embriones de Picea abies, informes que coinciden con lo expuesto aquí, excepto para el tratamiento con  $10^{-6}$  molar de ANA en que el callo presentó una coloración verde en el medio SH.

Citocinina. Las diferentes concentraciones de benciladenina (BA) en combinación con el medio SH, mostraron diferentes efectos sobre los embriones, así como la formación de brotes adventicios lo que comprueba el efecto organogénico de ésta citocinina.

En las bajas concentraciones se observó una tendencia a formar un menor número de brotes y más pequeños, al aumentar la concentración de BA también se incrementó el número de brotes en función de la concentración de BA.

A la concentración de  $10^{-6}$  molar de BA se observó el crecimiento de la raíz con la formación de un pequeño callo que se oxidó rápidamente esto último también se obser

Cuadro 10. Efecto de los tratamientos sobre los embriones de Pinus cembroides Zucc. cultivados en el medio DCR durante la inducción de brotes adventicios.

No.	TRATAMIENTOS		No. brotes máx. por embrión *	No. brotes por embrión ( $\bar{X}$ )	Tiempo de formación **	Tamaño de los brotes min y máx ***
	ANA	BA				
1	0	0	-	-	-	-
2	0	$10^{-6}$	-	-	-	-
3	0	$10^{-5}$	8	1.0	4-5	0.5 - 2.0
4	0	$2.5 \times 10^{-5}$	15	1.6	4-5	0.5 - 2.0
5	0	$10^{-4}$	-	-	-	-
6	$10^{-7}$	0	-	-	-	-
7	$10^{-7}$	$10^{-6}$	5	0.46	4-5	0.5 - 2.5
8	$10^{-7}$	$10^{-5}$	10	1.6	4-5	0.5 - 4.0
9	$10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-5}$	14	2.6	4-5	0.5 - 6.5
10	$10^{-7}$	$10^{-4}$	10	1.2	4-5	0.5 - 3.5

\* Número de brotes máximo obtenido en un embrión al ser disectados.

\*\* Tiempo en que se diferenciaron los brotes en semanas.

\*\*\* Tamaño en centímetros después de 16 semanas de iniciado el cultivo.



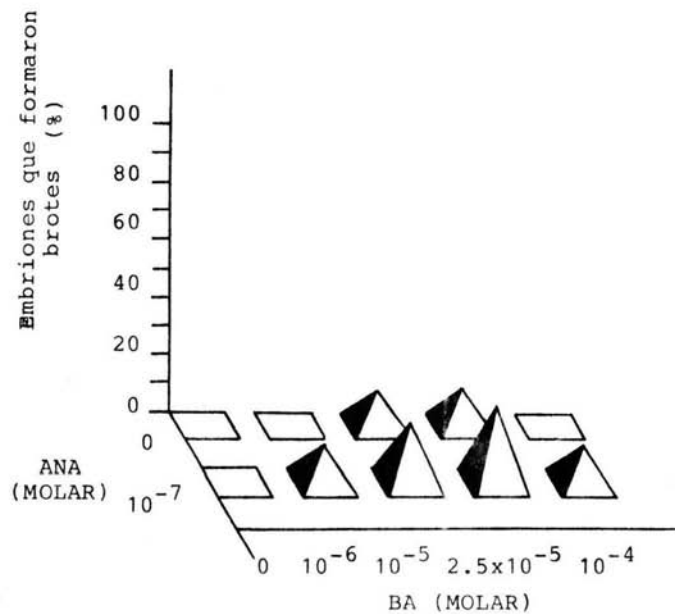


Figura 12. Efecto de las combinaciones de ANA y BA en la formación de brotes adventicios en el medio DCR.

vó en los otros tratamientos excepto a la concentración de  $2.5 \times 10^{-5}$  molar, donde los epicótilos quedaron cortos al igual que los cotiledones pero que aumentaron de volumen **considerablemente**, además no se desarrolló el epicótilo.

Las concentraciones de BA en combinación con el medio DCR, respondieron de manera diferente los embriones ya que solo se obtuvo la formación de brotes en dos tratamientos ( $10^{-5}$  y  $2.5 \times 10^{-5}$  molar). A la concentración más baja ( $10^{-6}$  molar) solo se observó el alargamiento del hipocótilo y del epicótilo con la formación de un pequeño callo en la zona de la radícula que se oxidó rápidamente, a la concentración más alta ( $10^{-4}$  molar) los embriones se desdiferenciaron en callo oxidándose completamente. (Ver cuadro 10 y figuras 12 y 14).

Al comparar las concentraciones de BA empleadas en otros trabajos donde se obtuvo la formación de brotes se observa que son semejantes, Webb y Street (1977) emplearon concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  molar en embriones de Pinus sitchensis y Pinus contorta, mientras que Arnold y Eriksson (1978) en embriones de Picea abies con  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  molar y  $5 \times 10^{-6}$  a  $10^{-6}$  molar. Reilly y Washer (1977) en embriones de Pinus radiata obtuvieron brotes en el 90% de los embriones con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.

En uno de los tratamientos de BA ( $2.5 \times 10^{-5}$  molar) en combinación con el medio DCR, se observó un embrión que mostró carácter albino que, no obstante, bajo las condiciones in vitro el embrión mostró crecimiento y capacidad morfogénica, en su radícula tuvo lugar la formación de callo que se oxidó parcialmente, sobre los cotiledones y la zona del epicótilo tuvo lugar la formación de las yemas adventicias, algunas de ellas se desarrollaron en

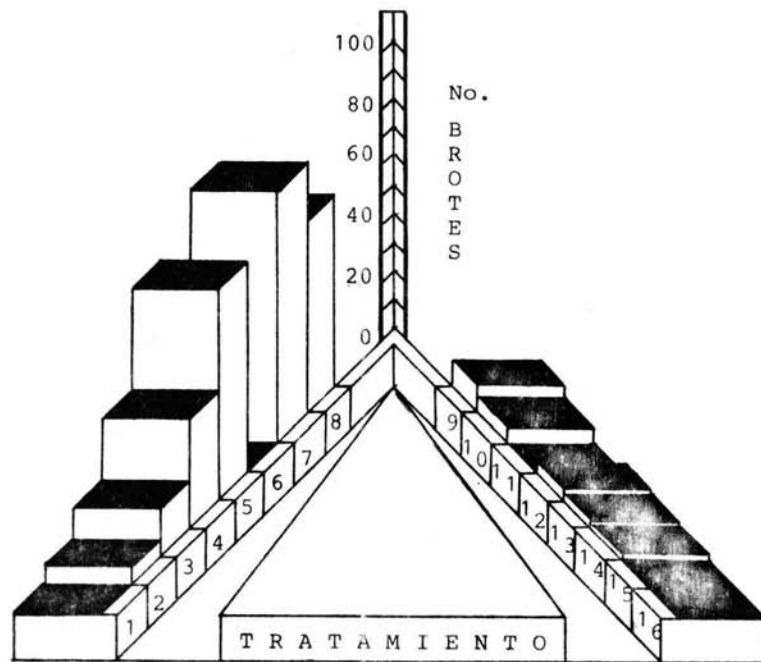


Figura 13. Número de brotes obtenidos por tratamiento en el medio SH.

brotos pero que al ser transferidos a medio fresco murieron. Se considera que se debe a la variabilidad genética del embrión.

Relación auxina/citocinina. De las 16 combinaciones con el medio SH, solo en cuatro se observó la formación directa de brotes sobre las estructuras embrionarias (cuadro 9 y figuras 15 y 16) en los tratamientos con  $10^{-6}$  molar de ANA con  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ó  $2.5 \times 10^{-5}$  molar de BA, solo se formaron brotes, cuando los inóculos se transfirieron al tratamiento con  $10^{-4}$  molar de BA, a partir de callo y su número fué muy bajo. (Cuadro 9).

La mayor cantidad así como los mejores brotes se registraron con la concentración más baja de ANA con las diferentes concentraciones de BA y la intensidad de respuesta disminuyó al aumentar la concentración de la citocinina. (Figura 11).

De manera semejante Kolevska, et al., (1983) mejoraron el porcentaje de inducción de yemas adventicias en embriones de Pinus nigra al combinar una auxina (ANA o AIB) con benziladenina (BA). Minocha (1980) obtuvo la mejor respuesta en la formación de brotes adventicios en embriones de Pinus strobus con la combinación de BA (0.1 y 1.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) con una auxina (1.0  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB). Por su parte Ellis y Bilderback (1984) mencionan que el suministro de BA fué indispensable para la inducción de yemas pero que el suministro de auxinas incrementó la respuesta en embriones de Pinus ponderosa.

Al incrementar las concentraciones de ANA con cualquier concentración de BA, la respuesta fue la formación de callo que se oxidó ocasionando la muerte del inóculo. Esto coincide con lo expuesto por Konar y Singh (1980); Arnold y Eriksson

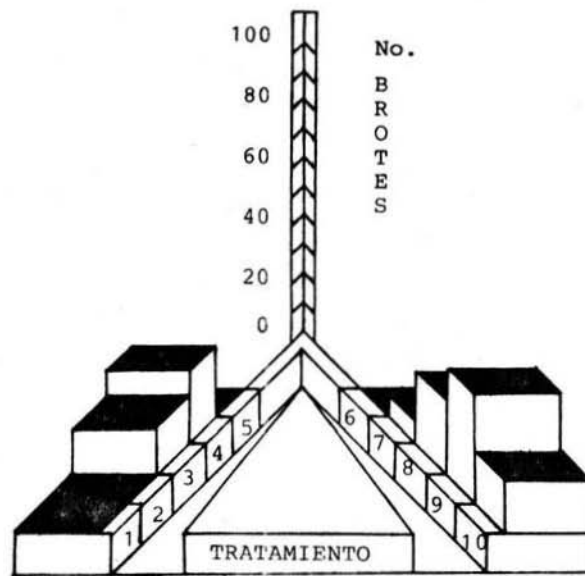


Figura 14. Numero de brotes obtenidos por tratamiento en el medio DCR.

(1981) y Abdullah, *et al.*, (1985), que mencionan que las altas concentraciones de ANA con BA resultan tóxicas o inhibitorias en la inducción de brotes (figura 11 y 13).

De las cuatro combinaciones de ANA con BA probadas con el medio DCR, también se obtuvo la formación de brotes aunque en menor proporción ya que el número de embriones que respondieron fue bajo; por el contrario en el medio SH, al incremento de la concentración de BA se mejoró la respuesta. En los embriones se formó callo en la zona de la radícula, que en algunos casos se extendió al epicótilo y los cotiledones, con la consecuente disminución de brotes. (Figura 12 y 14).

#### 4.1.3 Tiempo de inducción de brotes

La respuesta inicial observada al final de la primer semana en cultivo, fue el aumento de volumen, los cotiledones se abrieron y algunos hipocótilos se arquearon ligeramente al tiempo que se tornaban verdes. Las diferencias entre los tratamientos expresadas en los embriones fue en la cuarta semana, observándose la iniciación de los primordios de yemas en los tratamientos; con  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-5}$  molar de BA;  $10^{-7}$  molar de ANA combinado con  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-5}$  y  $10^{-4}$  molar de BA y con  $10^{-4}$  molar de BA fue hasta la séptima semana (cuadro 9 y 10). Las yemas se observaron como protuberancias generadas en la superficie; de ellas se derivaron los primordios de ascúculas, que semejaban pequeñas coronillas, las cuales se diferenciaron en verdaderos brotes en la sexta a séptima semana, excepto para el tratamiento con  $10^{-4}$  molar de BA, que fue necesario transferir a los embriones al medio de cultivo sin reguladores, lo que permitió su desarrollo a brotes entre la décima y décima segunda semana. (Figura 15 y 16).

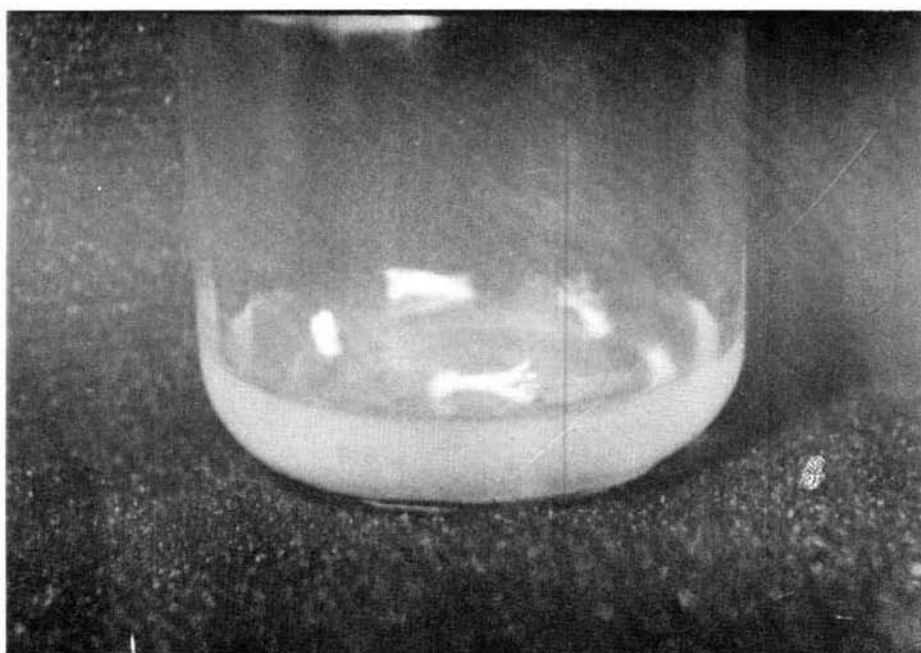


Figura 15. Inicio del cultivo de embriones de Pinus cembroides Zucc. en el medio SH a 6 días de cultivo.

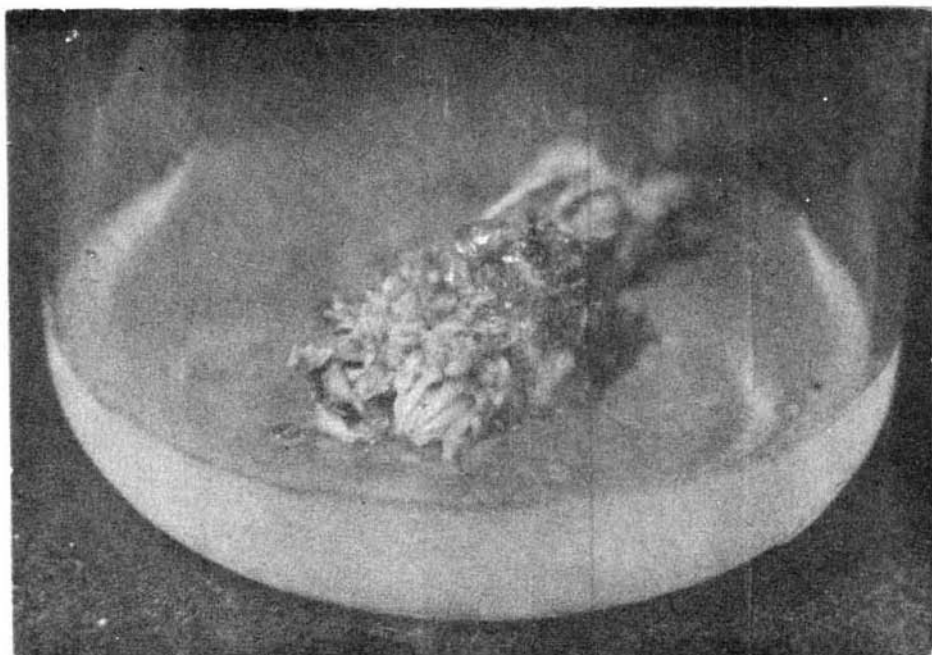


Figura 16. Formación de yemas adventicias sobre cotiledones y zona del epicótilo; se observa callo en la radícula.



Jelaska, et al., (1981) lograron solo el desarrollo de las yemas a brotes, generados en los cotiledones y embriones completos de Pinus nigra solo sí el medio empleado carecía de reguladores tal como sucedió en los brotes obtenidos en el tratamiento con  $10^{-4}$  molar de BA. En cuanto a la concentración de BA Arnold y Eriksson (1981) observaron que el desarrollo de las yemas fue poco frecuente y más lentamente en concentraciones mayores a  $10^{-5}$  molar.

El tiempo requerido para la inducción de yemas en varias especies es diferente; de dos a tres semanas mencionan Reilly y Washer (1977) en embriones de Pinus radiata; cuatro semanas en embriones de Pinus patula (Vargas, 1982); de cinco a seis semanas en embriones de Pinus brutia (Abdullah, et al., 1985) y hasta ocho semanas en Pinus monticola y Pinus ponderosa (Mott y Amerson, 1981 y Ellis y Bilderback, 1984 respectivamente).

Al comparar el tiempo de inducción en el medio SH con el medio DCR, se observó que en éste último las protuberancias se formaron en la tercera semana y los brotes ya diferenciados hacia la cuarta y quinta semana lo que muestra que la composición del medio de cultivo modifica el tiempo de inducción que en éste caso se redujo de seis a siete semanas en el medio SH a cuatro o cinco en el medio DCR. (Cuadro 11).

#### 4.1.4 Zonas de formación de los brotes sobre los embriones

Las principales zonas o estructuras embrionarias, donde tuvo lugar la formación de yemas adventicias, que se desarrollaron a brotes en los medios ensayados, se localizaron principalmente sobre los cotiledones, la base de los cotiledones y la zona del epicótilo (cuadro 11 y 12). Se observa que la mejor zona fué la del epicótilo y la base de los cotiledones y en menor cantidad los cotiledones, a pesar de que se formaron muchos brotes en los cotiledones que estuvieron en contacto con el medio de cultivo de manera semejante a lo observado por Reilly y Washer (1977) y Aitken, *et al.*, (1981).

Ellis y Bilderback (1984) observan la formación de brotes en la punta de los cotiledones y sobre todo el cotiledón cuando éste estuvo en contacto con el medio de cultivo; Arnold y Eriksson (1981) observaron que la formación de yemas ocurrió solo en la zona del epicotilo y al incrementar la concentración de BA la respuesta se extendió sobre los cotiledones; por el contrario Sommer, *et al.*, (1975) raramente observaron la formación de yemas entre el área del epicótilo y la base de los cotiledones, registrando la mayor cantidad de brotes en los cotiledones.

#### 4.1.5 Características de los brotes

Los brotes que mostraron un tallo bien definido, ascículas con longitud proporcional y con el meristemo apical definido donde se generan nuevas ascículas, se nombraron como brotes típicos.

Cuadro 11. Intensidad de respuesta a los diferentes tratamientos durante la inducción de brotes adventicios en el medio SH, en embriones de Pinus cembroides Zucc.

TRATAMIENTO (NUMERO)	FORMACION		ALARGAMIENTO			FORMACION DE BROTES EN		
	DE		DE			Cot	bCot	zEpi
	CALLO	RAIZ	Hipo	Cot	Epi			
1	-	++	++	+	+++	-	-	-
2	+	+	+	+	++	+	++	-
3	+	-	+	+	-	+	++	-
4	-	-	-	+	-	+	++	+
5	+	-	-	+	-	+	++	+++
6	+	+++	++	+	+	-	-	-
7	+	+	+	+	-	+	++	+++
8	+	-	-	+	+	+	++	+++
9	+	-	-	+	-	+	++	+++
10	++	-	-	+	-	+	++	+++
11	++	+	+	-	+	-	-	-
12	+++	-	-	-	-	-	-	-
13	+++	-	-	-	-	-	-	-
14	+++	-	-	-	-	+	-	-
15	+++	-	-	-	-	-	-	-

Hipo:hipocotilo;Cot:cotiledones;Epi:epicotilo;b:base;z:zona.

- sin respuesta; + baja; ++ regular; +++ buena.

Los brotes fueron diferentes en algunos tratamientos con el medio SH, así en el tratamiento con  $10^{-5}$  molar de BA las yemas formadas fueron muy pequeñas y muy pocas lograron desarrollarse a brotes, a pesar de ser transferidos al medio sin reguladores, en las concentraciones de  $10^{-5}$  y  $2.5 \times 10^{-5}$  de BA con  $10^{-7}$  molar de ANA se observaron brotes con ascúculas muy cortas sobre el tallo bien diferenciado lo cual sugiere una interrogante sobre la estabilidad genética de los brotes.

En el tratamiento 10 ( $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-4}$  molar de BA), además de los brotes típicos se formaron conglomerados de ascúculas que no mostraron tallo ni meristemo apical, los cuales fueron seccionadas para establecer subcultivos, en los que mostraron diferentes grados de oxidación sin que se diferenciaron en brotes. Además se obtuvieron brotes a partir de callo en los tratamientos con  $10^{-6}$  molar de ANA con  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $2.5 \times 10^{-5}$  de BA solo después de ser transferidos los embriones a medio con  $10^{-4}$  molar de BA, su número fue muy bajo y no sobrevivieron al ser disectados y subcultivados.

Los brotes formados en el medio DCR en los diferentes tratamientos mostraron las características de los brotes típicos ya descritos. El crecimiento de los brotes en ambos medios fué asincrónico, debido a que ciertas partes embrionicas estuvieron en contacto con los medios y empezaron a formar brotes más rápidamente y por lo tanto alcanzaron un mayor tamaño al momento de la evaluación; la diversidad genética también tuvo su participación como lo exponen Reilly y Washer (1977); Aitken, et al., (1981) y Ellis y Bilderback (1984).

Cuadro 12. Intensidad de respuesta a los diferentes tratamientos durante la inducción de brotes adventicios en el medio DCR, en embriones de Pinus cembroides Zucc.

TRATAMIENTO (NUMERO)	FORMACION DE		ALARGAMIENTO DE			FORMACION DE BROTES EN		
	CALLO	RAIZ	Hipo	Cot	Epi	Cot	bCot	zEpi
1	-	++	++	-	+++	-	-	-
2	+	-	+++	+	+++	-	-	-
3	+	-	++	+	-	-	-	++
4	+	-	+	+	-	+	++	++
5	+++	-	-	-	-	-	-	-
6	+	++	+++	-	+	-	-	-
7	+	-	++	+	-	-	+	++
8	+	+++	+	++	-	+	++	+++
9	++	-	+	++	-	+	++	+++
10	++	-	+	+	-	+	++	+++

Hipo:hipocotilo;Cot:cotiledones;Epi:epicotilo;b:base;z:zona.

- sin respuesta; + baja; ++ regular; +++ buena.

#### 4.1.6 Análisis estadístico para formación de brotes

El análisis estadístico solo se realizó para los primeros 15 tratamientos del medio SH en donde se obtuvo la formación de brotes y para los tratamientos ensayados con el medio DCR.

En el cuadro 13 se da el análisis de varianza para los tratamientos con el medio SH en donde se muestran diferencias significativas entre los tratamientos al nivel de 5%, ya que la F calculada fue mayor a la F de tablas, por lo tanto en el cuadro 14 se muestra el efecto de las diferentes combinaciones de ANA y BA en la formación de brotes en el medio SH según la prueba de DMSH de Tukey al nivel del 5%.

Se puede observar que el tratamiento 7 ( $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-6}$  molar de BA), fue significativamente superior a los demás seguido por las concentraciones de  $10^{-4}$  molar de BA y de  $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-5}$  molar de BA y con menor significancia el tratamiento con  $2.5 \times 10^{-5}$  molar de BA y el de  $10^{-5}$  molar de BA.

Como información complementaria a la formación de brotes, se dan en el cuadro 9 datos sobre el número de brotes por tratamiento; número máximo de brotes por embrión; promedio de brotes por embrión; tiempo de formación y el tamaño de los brotes después de 16 semanas de iniciado el cultivo.

Con respecto al medio DCR el análisis de varianza (cuadro 15) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que no fue necesario efectuar la prueba de Tukey (DMSH). Sin embargo en el cuadro 10 se muestra que se debió al bajo número de embriones que formaron brotes, al

Cuadro 13. Análisis de varianza para la formación de brotes en embriones de Pinus cembroides Zucc. cultivados en el medio SH.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIO CUADRADO	Fc *	Ft **
TRATAMIENTOS	14	859.57	61.39	11.04	1.67
ERROR	210	1168.667	5.56		
TOTAL	224	2028.24			

Fc es mayor que Ft por lo tanto existen diferencias entre los tratamientos.

\* Fc = calculada

\*\* Ft = de tablas al nivel de 5% de significancia.

Cuadro 14. Comparación de medias para el número de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos en el medio SH.

TRATAMIENTO	NUMERO DE BROTES( $\bar{X}$ )
1 testigo	0.0 a
2	0.46 ab
3	1.06 b
4	2.46 c
5	4.13 d
6	0.0 a
7	5.8 e
8	4.3 d
9	0.6 ab
10	0.33 ab
11	0.0 a
12	0.13 ab
13	0.2 ab
14	0.13 ab
15	0.0 a

Los valores con las mismas letras son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba DMSH de Tukey al nivel de 5%.



tomar en cuenta solo los embriones que formaron brotes se puede mencionar que los mejores tratamientos fueron los de  $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-5}$  y  $10^{-4}$  molar de BA y el de  $2.5 \times 10^{-5}$  molar de BA.

En el cuadro 10 se muestran los datos complementarios a la formación de brotes obtenidos en combinación con el medio DCR, donde se observa que el tiempo de formación se redujo a 4 ó 5 semanas y que su tamaño fué superior a los obtenidos en el medio SH.

#### 4.2 Crecimiento de los brotes

Cuando se diferenciaron los brotes en los embriones éstos se disectaron y transfirieron al mismo medio (SH) sin reguladores de crecimiento y con reducción en la concentración de sacarosa de  $30 \text{ gL}^{-1}$  a  $20$  y  $10 \text{ gL}^{-1}$ . El alargamiento de los brotes fué evidente entre la tercera y cuarta semana de ser disectados, los brotes más pequeños sobrevivieron menos que los mayores a los 5 mm. Con respecto al efecto de la concentración se observó que los brotes que se colocaron en el medio SH con  $20 \text{ gL}^{-1}$  crecieron más. (Figuras 17 y 18).

En el cuadro 9 se da el tamaño mínimo y máximo observado en los brotes, desde el inicio del cultivo de los embriones en el medio SH, que incluye la etapa de inducción (6 a 7 semanas) y el alargamiento de los brotes (9 semanas).

Los brotes obtenidos en el medio DCR, mostraron mayor crecimiento ya que no fué necesario disectarlos, debido al buen tamaño que alcanzaron después de 10 semanas en cultivo (cuadro 10), lo que muestra que la composición del medio influye en el crecimiento de los brotes formados.

Cuadro 15. Análisis de varianza para la formación de brotes en embriones de Pinus cemboides Zucc. cultivados en el medio DCR.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIO CUADRADO	Fc*	Ft**
TRATAMIENTOS	9	103.754	11.529	1.59	1.63
ERROR	140	1011.07	7.22		
TOTAL	149	1114.834			

Fc es menor que la Ft por lo tanto no existen diferencias entre los tratamientos, por lo que no es necesario hacer la prueba de DMSH de Tukey.

\* Fc = calculada

\*\* Ft = de tablas al nivel de 5% de significancia.



Figura 17. Desarrollo de las yemas adventicias a brotes. En el medio SH sin reguladores de crecimiento.

La forma de obtener el alargamiento de los brotes obtenidos en el medio SH, fué con la eliminación de los reguladores de crecimiento como mencionan Arnold y Eriksson (1981) y Vargas (1982), aunque ellos también variaron la concentración del medio.

Con respecto a la concentración de sacarosa Arnold (1987) observó que 1.5% de sacarosa fué mejor que el 2 y 3%, aunque menciona que es necesaria para el desarrollo de los brotes. Abdulla, et al (1985) no encontraron diferencias en el alargamiento de las yemas a brotes con la adición de 1 y 2% de sacarosa al medio empleado.

El alargamiento de los brotes también se estimuló en el medio adicionado con carbón activado (Boulay, 1979 y Arnold y Eriksson, 1981) y con la adición de bajas concentraciones de AIA ( $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  molar) como lo mencionan Boulay y Franclet (1977).

#### 4.3 Respuestas de los brotes durante la inducción de raíz

##### 4.3.1 Respuestas en los ensayos in vitro

##### 4.3.1.1 Efecto de la reducción de la concentración de sacarosa y del medio SH

Al emplear el medio SH al 50% de su concentración original, se obtuvo una mayor sobrevivencia (80%) de los brotes cuando se adicionó  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, mientras que solo se obtuvo el 50% cuando el medio contenía  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa.

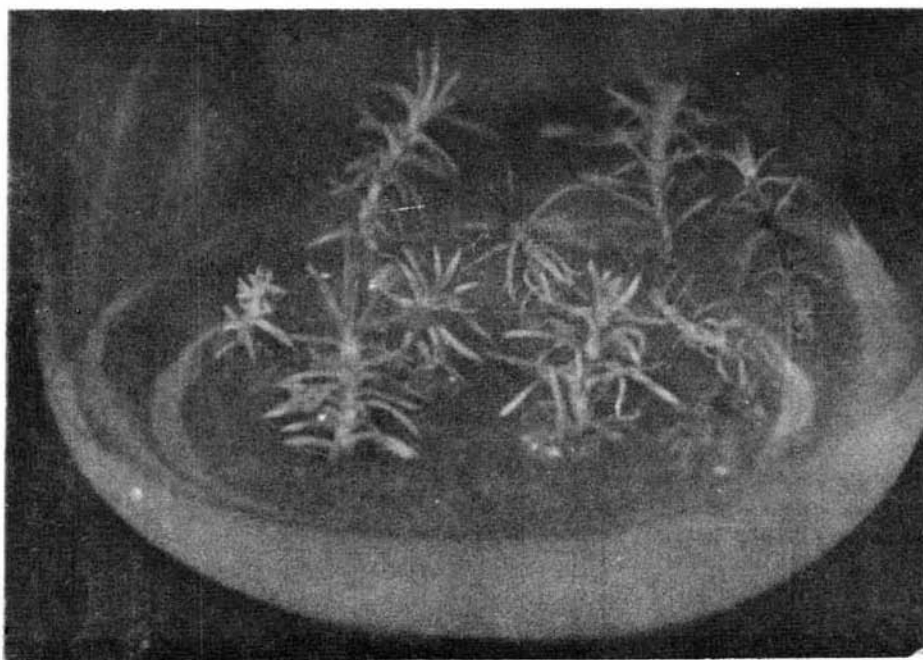


Figura 18. Brotes disectados para su alargamiento en el medio básico SH sin reguladores de crecimiento.

Los brotes que sobrevivieron siguieron creciendo, pero en ninguno de ellos se observó la formación de raíz, solo una cicatriz en la base donde se efectuó el corte para separarlo del embrión.

Con respecto al efecto del carbón activado no se observaron diferencias en la respuesta de los brotes, empleados para éste ensayo, que fué evaluado después de ocho semanas.

A diferencia de los trabajos realizados por Campbell y Durzan (1976); Somer et al., (1975) y Vargas (1982) en que si obtuvieron la diferenciación de raíces eliminando los reguladores de crecimiento y reduciendo la concentración del medio y sacarosa adicionando carbón activado, en los brotes de Pinus cembroides no fué factible.

#### 4.3.1.2 Efecto del enraizador en polvo y líquido

La evaluación del ensayo en que se empleó el enraizador en polvo se efectuó después de cuatro semanas y en el cuál no se tuvo pérdida de brotes y en ellos se formó callo de color verde o café en la base, de consistencia dura y compacta, sus tamaños fueron de 2 a 5 mm de diámetro. Además en el 20% de los brotes se observó desdiferenciación del tallo y de las hojas basipétalas, que posteriormente causó la muerte del meristemo apical y a la sexta semana se incrementó la proliferación del callo. (Figura 19).

En el ensayo con el enraizador líquido (Radix) se obtuvo como única respuesta la formación de callo en la base de los brotes, de consistencia dura y compacta, su tamaño dependió del tiempo de exposición en el enraizador. Así los brotes que se mantu

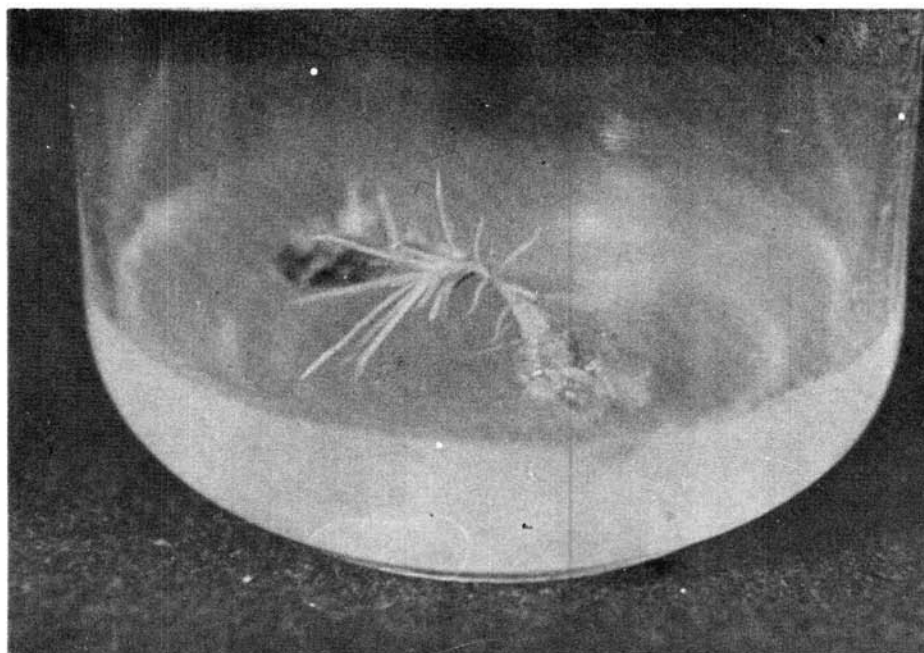


Figura 19. Formación de callo en la base del brote, después de aplicar el enraizador en polvo (10 000 ppm de AIB y 300 ppm de ANA) y cultivados en el medio SH sin reguladores.

vieron durante 5 min tuvieron en promedio 3 mm de diámetro; los de 10 min de 5 mm y los de 15 min de 8 mm. A diferencia con el enraizador en polvo no se observó la desdiferenciación de los brotes, la evaluación del ensayo se realizó después de ocho semanas. (Figura 20).

#### 4.3.1.3 Efecto de la combinación de ANA y AIB en medio SH

Los brotes se mantuvieron durante ocho semanas en los tratamientos (cuadro 6), se formó callo en su base de color blanco o crema, excepto el tratamiento con  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB que fué de color verde. El tamaño de los callos fué de 2 a 5 mm de diámetro. En los tratamientos con las concentraciones de 0.05 y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA con cualquier combinación de AIB, el callo creció alcanzando al tallo primero aumentó de volumen, mostrando sinuosidad y ascúculas muy cortas causando finalmente la desdiferenciación.

A bajas concentraciones de ANA y AIB los brotes mostraron ascúculas largas y unidas al tallo recto. En ningún tratamiento se observó la formación de raíces, incluso después de ser transferidos al medio básico sin reguladores de crecimiento durante ocho semanas, los brotes solo mostraron crecimiento del tallo y formación de ascúculas y el callo proliferó muy poco. El 50% de los brotes se utilizó para un ensayo extra in vitro.



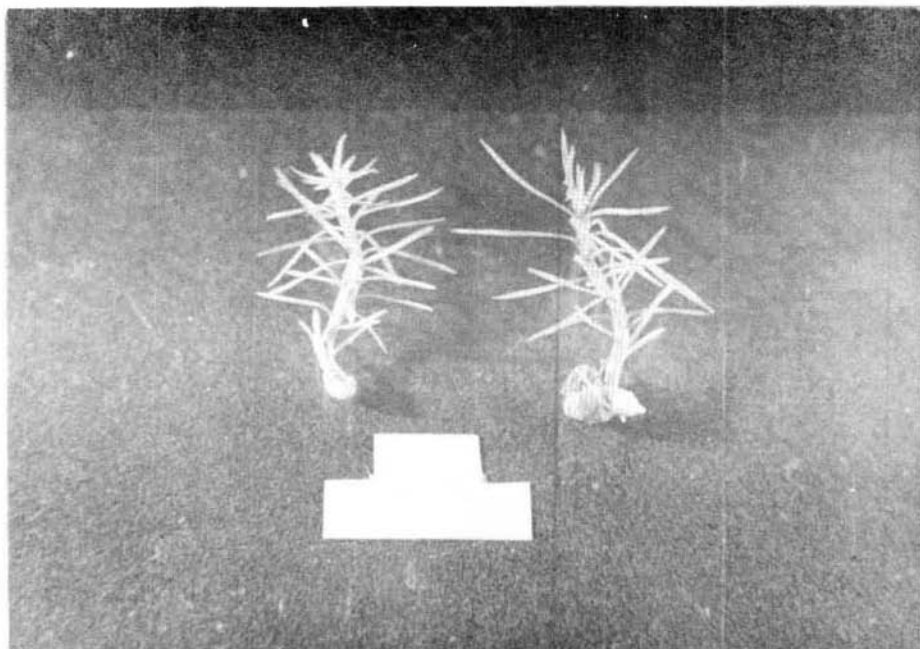


Figura 20. Efecto del enraizador " Radix ".  
(10 000 mg de AIB y 30 mg de ANA)  
aplicado en la base del brote y  
cultivados en el medio SH sin re-  
guladores.

#### 4.3.1.4 Efecto del medio DCR

Al probar el medio DCR (Gupta y Durzan, 1985) al 100% de su concentración con reducción de sacarosa al 0.5 % y sin la adición de reguladores de crecimiento; los brotes desarrollaron un pequeño callo de color crema o café de 2 a 5 mm de diámetro. El crecimiento de los brotes fué muy pronunciado alcanzando algunos de ellos hasta 10 cm de longitud con el tallo sinuoso. las hojas basipétalas se secaron pero en ninguno de ellos se obtuvo la formación de raíz, la evaluación se efectuó en la octava semana.

#### 4.3.1.5. Efecto de las combinaciones de auxinas con BA y AIB con sacarosa en el medio DCR

En el cuadro 6 se muestran los diferentes tratamientos ensayados. En todos se formó callo en la base de los brotes y los tallos mostraron sinuosidad, excepto en las concentraciones altas de sacarosa (3y6%) que fueron rectos y de color verde más intenso, algunos brotes formaron callo en porciones del tallo. El tamaño de los callos varió de 2 a 10 mm siendo los mayores los que estuvieron en las concentraciones altas de sacarosa.

Después de cuatro semanas los brotes fueron transferidos al mismo medio pero sin reguladores de crecimiento y con 0.5% de sacarosa y se mantuvieron en éstas condiciones durante ocho semanas sin mostrar formación de raíces.

#### 4.3.1.6 Efecto del enraizador líquido adicionado al medio DCR

El enraizador líquido (Radix) fué filtrado en milipore y adicionado al medio DCR a diferentes cantidades, observándose que al añadir 10 y 15 ml los brotes murieron hacia la tercer semana, probablemente por los altos niveles de auxinas (1000 y 500 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 3.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA respectivamente). En los otros tratamientos en que la concentración de los reguladores fué menor, se formó callo en la base de los brotes y posteriormente se transfirieron al mismo medio pero sin el enraizador y se registró un crecimiento en el tallo y la formación de ascúculas pero no se desarrolló ninguna estructura rizógena después de haber estado cuatro semanas en el medio inductor y otras cuatro en el medio sin el enraizador.

#### 4.3.2 Extra in vitro

Se realizaron dos ensayos uno de ellos fué usando brotes disectados del embrión y que fueron inmersos en el enraizador líquido (Radix) durante dos minutos y después se colocaron en macetas que contenían tierra de monte y agrolita (2:1 v/v y cubiertos con bolsas de plástico, éstos brotes permanecieron en el cuarto de incubación durante seis semanas y fueron removidos para su revisión, los cuales no mostraron formación de raíces ni callo.

En el otro ensayo se usó el 50 % de los brotes empleados en el punto 4.3.1.3; con AIB y ANA en combinación con el medio SH y que se transfirieron al mismo medio sin reguladores durante ocho semanas y que finalmente se transplantaron a la mezcla de tierra de monte y agrolita, retirando el agar de la base con callo usando agua destilada esterilizada y que fueron cu-

biertos con bolsas de plástico. Los brotes permanecieron verdes, crecieron y algunos formaron brotes laterales después de ocho semanas sobreviviendo 34 de 50 pero sin formar raíces. (Figuras 21 y 22).

Las condiciones para inducir raíz suelen ser variadas como lo demuestran los resultados obtenidos en muchas coníferas dando una muestra al respecto: Winton y Verhagen (1977) que solo obtuvieron el 5% de enraizado en brotes de Pseudotsuga menziesii con 10 microgramos por litro de AIB; Sommer, et al., (1975) observaron la formación de raíces en el medio sin reguladores, pero dicha respuesta se incrementó al suministrar 10 ppm de AIB al medio en brotes de Pinus palustris.

Para obtener el óptimo de enraizado en brotes de Pinus taeda deberían tener una longitud mínima de 5 mm con un tallo bien diferenciado y estar durante cinco semanas en el medio de cultivo conteniendo  $0.05 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA donde Mehra-palta, et al., (1977), obtuvieron el 50% de enraizado, además niveles semejantes se lograron en condiciones no asépticas, con niebla y los brotes fueron más vigorosos.

Cheng y Voqui (1977) lograron inducir raíz en brotes de Pseudotsuga menziesii al ponerlos en un medio con 0.5% de sacarosa y 0.25 micromoles de ANA transferidos al mismo medio pero sin reguladores y finalmente a condiciones no asépticas y obtuvieron el 90 % de sobrevivencia de los brotes.

Los niveles de enraizamiento in vitro son generalmente bajos y requieren cambios frecuentes de medios, por lo que muchos investigadores sugieren el uso del enraizamiento directo bajo condiciones no asépticas con niebla o alta humedad ambiental. Webb y Street (1977) enraizaron el 20% de brotes de Picea sitchensis y Pinus contorta bajo niebla y además observaron que los brotes derivados de callo iniciado con 2iP o cinetina enraizan mejor que los obtenidos con otras citocininas,

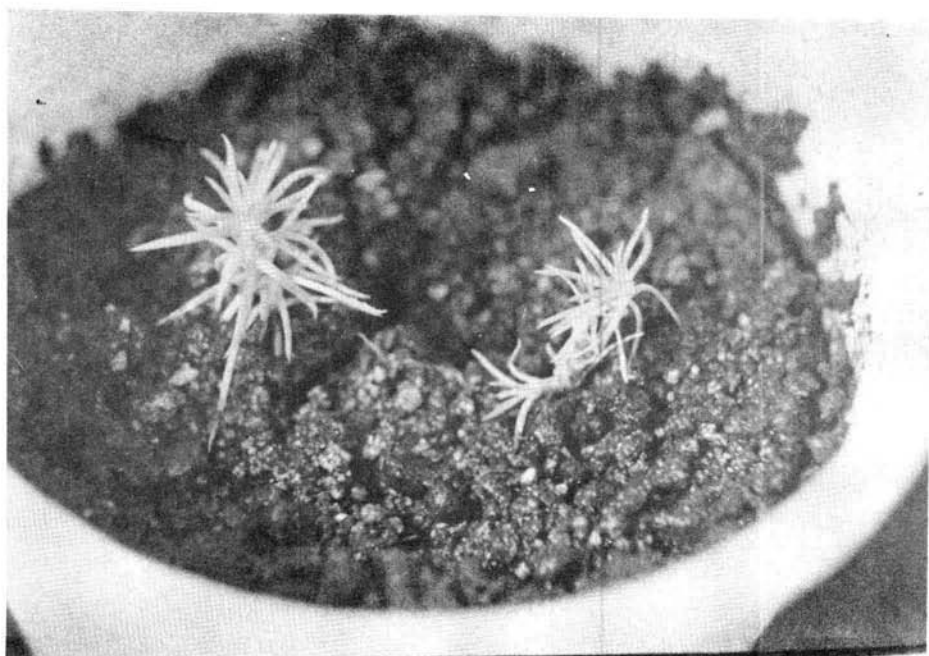


Figura 21. Brotes transferidos a tierra de monte/agrolita (2:1 v/v) bajo condiciones no asépticas, se observa el crecimiento de un brote lateral.

Horgan y Aitken (1981) en un estudio comparativo en la formación de raíces en brotes de Pinus radiata bajo condiciones in vitro y no asépticas, obtuvieron el 34 y 86% respectivamente.

Con lo que respecta a la especie en estudio desafortunadamente no se logró la inducción de raíz en ninguno de los ensayos planteados, por lo que sugiere buscar las condiciones óptimas que permitan inducir favorablemente raíz bajo condiciones in vitro y no asépticas o extra in vitro, haciendo énfasis en el uso de otras auxinas considerando su concentración y tiempo de exposición, así como de algunos componentes del medio como nitratos y boro.

En cuanto a la inducción de raíz a brotes bajo condiciones no asépticas es importante considerar en futuros trabajos la humedad ambiental, ensayar diferentes temperaturas y fotoperiodo, además el uso de enraizadores comerciales deberá ser una opción que no deberá descartarse.



Figura 22. Efecto residual de las auxinas (ANA  $0.01 \text{ mgL}^{-1}$  con  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB) después de transferir el brote a la mezcla de tierra de monte/agrolita (2:1 v/v).

## 5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en éste trabajo, se muestra que es posible la obtención de brotes adventicios en embriones de Pinus cembroides Zucc., cultivados in vitro con el suministro de nutrimentos y reguladores de crecimiento adecuados, lo cuál es una evidencia de que es posible la obtención de plántulas, una vez que se superen los obstáculos relacionados con la formación de raíz.

La formación de brotes en embriones de la especie en estudio puede obtenerse por el suministro de altas concentraciones de BA ( $2.5 \times 10^{-5}$  y  $10^{-4}$  molar) o por la combinación de  $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-6}$  o  $10^{-5}$  molar en el medio SH y en menor intensidad en el medio DCR con la combinaciones de  $10^{-7}$  molar de ANA con  $10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-5}$  y  $10^{-4}$  molar de BA.

El alargamiento de los brotes obtenidos con el medio SH se logró satisfactoriamente con la reducción de sacarosa de  $30 \text{ gL}^{-1}$  a  $20 \text{ gL}^{-1}$ , sin reguladores de crecimiento y al 100 % de su concentración, independientemente del aporte de carbón activado.

Las principales estructuras embrionarias, involucradas en la formación de brotes fueron: la zona del epicótilo, la base de los cotiledones y los cotiledones, con respecto a la formación de callo, éste siempre se inició en la porción de la radícula, extendiéndose en algunos tratamientos a las demás estructuras.



La composición del medio de cultivo empleado, puede dar resultados diferentes, como los obtenidos en éste trabajo con el medio SH y el DCR, donde los mejores tratamientos para la inducción no fueron los mismos, incluso el alargamiento de los brotes en el medio DCR fué muy favorable, ésto muestra que existe una interacción entre el medio y los reguladores.

Es evidente que ésta técnica, permitirá la obtención de cantidades apreciables de plántulas provenientes de una fuente o inóculo, sin embargo existen muchos problemas por resolver, que nos permitirá comprender los factores determinantes en cada una de las etapas involucradas en la propagación in vitro. Además se debiera intensificar los trabajos de ésta índole, utilizando diferentes inóculos y con las especies más importantes de nuestro país.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, A.A., M.M. Yeoman y J. Grace. 1985. *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of Pinus brutia Ten. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 5:35-44.
- Ahuja, M.R. 1982. Isolation culture and fision of protoplast: Problems and prospect. *Silvae Gnetica*. 31(1-2):66-76.
- Aitken, J., K.J. Horgan y T.A. Thorpe. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of Pinus radiata. *Can. J. For. Res.* 11:112-117.
- Arnold, S.von. 1987. Effect of sucrose on starch accumulation in and adventitious bud formation on embryos of Picea abies. *Annals of Botany*. 59:15-22.
- Arnold, S.von. y T. Eriksson. 1978. Induction of adventitious buds on embryos of norway spruce *in vitro*. *Physiol. Plant.* 44:283-287.
- Arnold, S.von. y T. Eriksson. 1979. Induction of adventitious bud on bud of norway spruce (Picea abies) grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 45:29-34.
- Arnold, S.von. y T. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in Pinus contorta. *Can. J. Bot.* 59:870-874.
- Barrientos, P.L. 1983. Estudio morfogénico *in vitro* de inóculos provenientes de árboles jóvenes de Pinus cembroides Zucc., P. patula Schl. et Cham. y P. pseudostrobus Lindl.
- Birchem, R., H.E. Sommer y C.L. Brown. 1981. Scanning electron microscopy of shoot and root development in sweetgum callus tissue culture. *Forest. Sci.* 27(1):206-212.
- Bonga, J.M. 1977. Applications of tissue culture in forestry. In: *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture*. Reinert, J. y Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp.93-108.

- Bonga, J.M. 1982. Vegetative propagation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: Tissue culture in forestry. Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Martinus Nijhoff. The Hague Netherlands. pp. 387-412.
- Bornman, C.H. 1983. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of Picea abies in vitro. *Physiol. Plant.* 57:5-16.
- Boulay, M. y A. Franclet. 1977. Recherches sur la propagation végétative du Douglas: Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco. Possibilités d'obtention de plants viables à partir de la culture in vitro de bourgeons de peds-mares juveniles. *C.R. Acad. Sci.* 284:1405-1407.
- Boulay, M. 1979. Propagation in vitro du Douglas par micropropagation de germination aseptique et culture de bourgeons dormant'. *Etudes Rech. AFOCEL.* 12:67-75.
- Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of Picea glauca. *Can. J. Bot.* 53:1652-1657.
- Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1976. Vegetative propagation of Picea glauca by tissue culture. *Can. J. For. Res.* 6 (2):240-243.
- Chalupa, V. y D.J. Durzan. 1973. Development of isolated Norway spruce (Picea abies) tissue and cell cultures. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae.* 8:111-125.
- Cheng, T.Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (Pseudotsuga menziesii Mirb. Franco). *Plant. Sci. Lett.* 5:97-103.
- Cheng, T.Y. 1976. Vegetative propagation of western hemlock (Tsuga heterophylla) through tissue culture. *Plant. Cell. Physiol.* 17:1347-1350.
- Cheng, T.Y. y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. *Science.* 198:306-307.
- David, A. 1982. In vitro propagation of gymnosperm. In: Tissue culture in forestry. Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Martinus Nijhoff. The Hague Netherlands. pp. 72-108.

- David, H., K. Isemukali y A. David. 1978. Obtention de plants de pin maritime (Pinus pinaster Sol.) a partir de branchyblastes ov d'apex caulinares de tres jeunes sujets cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci. Paris. 287:245-248.
- David, H., A. David y T. Matielle. 1982. Evaluation of parameters affecting the yield, viability and cell division of Pinus pinaster protoplast. *Physiol. Plant.* 56: 108-113.
- Durzan, D.J. 1982. Cell and tissue culture in forestry industry. In: Tissue culture in forestry. Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Martinus Nijhoff. The Hague Netherlands. pp. 36-71.
- Durzan, D.J. y R.A. Campbell. 1974. Prospect for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. *Can. J. For. Res.* 4: 151-174.
- Eguiluz, P.T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género Pinus en México. Tesis Profesional UACH. Departamento de Bosques. Chapingo México. 623 pp.
- Eguiluz, P.T. 1985. Descripción botánica de los pinos mexicanos. Division de Ciencias Forestales de la UACH. Chapingo México. pp. 45.
- Ellis, D.D. y D.E. Bilderback. 1984. Multiple bud formation by cultured embryos of Pinus ponderosa. *J. Plant. Physiol.* 115: 201-204.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
- Gautheret, R.J. 1934. Cultiv de tissu cambial. *Compt. Rendu. Acad. Sci.* 198: 2195-2196.
- Gupta, P.K. y D.J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from matures trees of Douglas fir (Pseudotsuga menziesii). *Plant. Cell. Report.* 4 (4): 177-179.
- Harold, W. y Jr. Hoker. 1984. Introducción a la biología forestal. AGT Editor. México. pp. 39-58.

- Horgan, K. y J. Aitken. 1981. Reliable plantlet formation from embryos and seedling shoot tips of radiata pine. *Physiol plant.* 53:170-175.
- Hricova, D., D. Liscova y M. Cierna. Root formation spruce tissue culture culture (*Picea excelsa* Linl.) Colloque International sur la culture in vitro des essences forestieres. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp. 246-250.
- Jansson, E. y C. H. Bornman. 1980. In vitro phyllomorphic regeneration of shoot bud and shoot in Picea abies. *Physiol. Plant.* 49:101-111.
- Jansson, E. y C. H. Bornman. 1981. In vitro initiation of adventitious structures in relation to the abscission zone in needle explants of Picea abies: anatomical considerations. *Physiol Plant.* 53:191-197.
- Jelaska, S., B. Kolevska-Pletikapic y M. Vidakovic. 1981. Bud regeneration in Pinus nigra embryo and seedling tissue culture. Colloque International sur la culture in vitro des essences forestieres. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp. 159-166.
- John, A. 1983. Tissue culture of coniferous trees. In: Tissue culture of trees. Dodds, J. H. (Ed.) Croom Helm. London & Canberra. pp. 6-21.
- Kolevska-Pletikapic, B., Jelaska y J. Berljak. 1983. Bud and shoot formation in juvenile tissue culture of Pinus nigra. *Silvae Genetica.* 32:(3-4):115-118.
- Konar, R. N. 1963. Studies on submerged callus culture of Pinus gerardiana. *Phytomorphology.* 14:165-168.
- Konar, R. N. y M. N. Singh. 1980. Induction of shoot buds from tissue culture of Pinus wallichiana. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 99. S: 173-177.
- Lloyd, G. B. y B. H. McCown. 1980. In: Proceeding of the International Plant Propagation Society. 30:421-427.

- Mapes, M.O., P.M. Young y J.B. Zaerr. 1981. Multiplication in vitro du Douglas (Pseudotsuga menziesii) par la induction precoce d'un bourgeonnement adventif et axillaire. Colloque International sur la culture in vitro des essences forestieres. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp. 109-114.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. 2a. Ed. Botas México. pp. 82-90.
- Mehra-Palta, A., R.H. Smeltzer y R.L. Mott. 1977. Hormonal control of induce organogenesis from excised plant parts of loblolly pine (Pinus taeda L.) In: TAPPI Forest Biology Wood Chemistry Conference. 15-20.
- Mehra-Palta, A. y M. Anand. 1983. Callus of Pinus roxburghii (Chirpine) and its cytology. *Physiol. Plant.* 58:282-286.
- Minocha, S.C. 1980. Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (Pinus strobus). *Can. J. Bot.* 58:366-370.
- Mott, R.L. y H.V. Amerson. 1981. Tissue culture plantlets produce from Pinus monticola embryonic materials. *Forest. Sci.* 27 (2):299-304.
- Naranayaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Reinert, J.Y.P.S. Bajaj (Eds.) Springer-Verlag. Berlin. pp. 179-248.
- Niembro, R.A. 1986a. Arboles y arbustos útiles de México. Limusa. México. pp. 142-143.
- Niembro, R.A. 1986b. Mecanismos de reproducción sexual en pinos. Limusa. México. 130 pp.
- Patiño, V.F. 1973. Flowering, fruting, cone collection and some aspect from seed on the mexican pines. International Symposium on Seed Processing. Bergen, Norway. Vol. II No. 22.
- Rancillac, M., M. Faye y A. David. 1982. In vitro rooting of cloned shoot in Pinus pinaster. *Physiol Plant.* 53:97-101.

- Reilly, K. y C.L. Brown. 1976. In vitro studies of bud and shoot formation in Pinus radiata and Pseudotsuga menziesii. Georgia Forest. Res. Paper. 86:1-9.
- Reilly, K. y J. Washer. 1977. Vegetative propagation of radiate pine by tissue culture: plantlets formation from embryonic tissue. N.Z.J. For. Sci. 7 (2):199-206.
- Salmia, M.A. 1975. Cytological studies on tissue culture of Pinus cembra Physiol. Plant. 33:58-61.
- Schenk, R.W. y A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Schmidt, A. 1924. Ueber die Entwicklung des Embryos im Koniferenembryo. Bot. Arch. 5:260-282.
- Simola, L.L. y J. Honkanen. 1983. Organogenesis and fine structure in megagametophyte callus lines of Picea abies. Physiol. Plant. 59:551-561.
- Sommer, H.E., C.L. Brown y P.P. Kormanik. 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (Pinus palustris Mill.) tissue cultured in vitro. Bot. Gaz. 139(2):196-200.
- Thompson, D.G. y J.B. Zaerr. 1981. Induction of adventitious buds on cultured shoot tips of Douglas fir (Pseudotsuga menziesii Mirb. Franco) Colloque International sur la culture in vitro des essences forestières. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp. 167-174.
- Toribio, M. y J.A. Pardos. 1981. In vitro organogenesis of Pinus sylvestris L. tissues. Colloque International sur la culture in vitro des essences forestières. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp. 143-148.
- Vargas, H.J. 1982. Morfogénesis in vitro de Pinus patula Schl. et Cham. Teis Profesional. Departamento de Bosques UACH. Chapingo. MEXICO. 126 pp.
- Vidalie, H., et al. 1986. Cultivo in vitro. Editorial científica México. 190 pp.

- Washer, J., K.J. Reilly y J.R. Barnett. 1977. Differentiation in Pinus radiata callus culture: The affect of nutrients. N.Z.J. For. Sci. 7(3):321-328.
- Webb, K.J. y H.E. Street. 1977. Morphogenesis in vitro of Pinus and Picea. Acta Hort. 78:259-269.
- Whitehill, S.J. y W.W. Schwabe. 1975. Vegetative propagation of Pinus sylvestris. Physiol. Plant. 35:66-71.
- Winton, L.L. y O. Huhtinen. 1976. Tissue culture of trees. In: Modern methods in forest genetics. Miksche, E.J.P. (Ed.) Springer-Verlag. Berlin. pp. 243-264.
- Winton, L.L. y S.A. Verhagen. 1977. Embryois in suspension cultures of Douglas fir and loblolly pine. TAPPI. Forest Biology and Wood Conference. pp. 21-24.
- Zaerr, J.B, y M.O. Mapes. 1982. Action of growth regulators. In: Tissue culture in forestry. Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Martinus Nijhoff. The Hague Netherlands. pp. 231-155.



## ANEXO No.1

## Preparación de soluciones concentradas

SOLUCION	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
Sol. A (10X) $\text{KNO}_3$ 2.5 g	25 g	12.5 g	6.25 g	2.5 g
Sol. B (100X) $\text{CaCl}_2$ 0.2 g	20 g	10 g	5 g	2 g
Sol. C (100X) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.3 g	30 g	15 g	7.5 g	3 g
Sol. D (100X) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01g	1 g	0.5 g	0.25 g	0.01g
0.001g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g	0.05 g	0.025g	0.01g
0.002g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2g	0.1 g	0.05 g	0.02g
0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 g	20 g	10 g	4 g
Sol. E (200X) KI 0.001g	0.2g	0.1 g	0.05 g	0.02g
0.0001g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02g	0.01 g	0.005g	0.001g
Sol. F (200X) $\text{H}_3\text{BO}_3$ 0.005g	1 g	0.5 g	0.25 g	0.1 g
Sol. G (100X) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g	15 g	7.5 g	3.75 g	1.5 g
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	2 g	1 g	0.5 g	0.2 g
Sol. H (100X) Tiamina.HCl 0.005g	0.5g	0.25 g	0.125g	0.05 g
0.005g Ac.nicotínico	0.05g	0.25 g	0.125g	0.05 g
0.0005g Piridoxina.HCl	0.05g	0.025g	0.0125g	0.005g
Mio-inositol	10 g	5 g	2.5 g	1 g

## MEZCLA DE SOLUCIONES

SOLUCION	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
A	100 ml	50 ml	25 ml	10 ml
B	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
C	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
D	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
E	5 ml	2.5 ml	1.25 ml	0.5 ml
F	5 ml	2.5 ml	1.25 ml	0.5 ml
G	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
H	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml

## ANEXO No.2

## PREPARACION DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DEL MEDIO DCR.

SOLUCION (100X)	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
<u>Solución A</u>				
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	40 g	20 g	10 g	4 g
$\text{KNO}_3$	34 g	17 g	8.5 g	3.4 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	55.6 g	27.8 g	13.9 g	5.56 g
<u>Solución B</u>				
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37 g	18.5 g	9.25 g	3.7 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 g	0.0125g	0.0062g	0.0025g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86 g	0.43 g	0.215 g	0.086 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.23 g	1.115	0.557 g	0.223 g
<u>Solución C</u>				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.5 g	4.25 g	2.125 g	0.85 g
KI	0.083 g	0.0415g	0.0207g	0.0083g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025g	0.00125g	0.00062g	0.00025g
$\text{NiCl}_2$	0.0025g	0.00125g	0.00062g	0.00025g
<u>Solución D</u>				
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17 g	8.8 g	4.25 g	0.17 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025 g	0.0125g	0.0062g	0.0025g
$\text{H}_3\text{BO}_4$	0.62 g	0.31 g	0.155 g	0.062 g
<u>Solución E</u>				
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78 g	1.39 g	0.695 g	0.278 g
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	3.73 g	1.86 g	0.932 g	0.373 g

SOLUCION (100X)	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
-----------------	---------	--------	--------	--------

---

Solución F

Glicina	0.2 g	0.1 g	0.05 g	0.02 g
Tiamina.HCl	0.1 g	0.05 g	0.025 g	0.01 g
Acido nicotínico	0.05 g	0.025 g	0.0125 g	0.005 g
Piridoxina.HCl	0.05 g	0.025 g	0.0125 g	0.005 g
Mio-inositol	20 g	10 g	5 g	2 g

---

## MEZCLA DE SOLUCIONES

SOLUCION	1000 ml	500 ml	250 ml	100 ml
A	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
B	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
C	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
D	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
E	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml
F	10 ml	5 ml	2.5 ml	1 ml

---

## FE DE ERRATAS

En la página iii, en el inciso 3.5.1 dice: Análisis estadístico; debe decir :Análisis estadístico.

En la página 45, en el cuadro 2 en la última línea dice: Agar 7500 7500; debe decir: Agar 7500 6000.

En la página 76, en el segundo párrafo en la primer línea dice: enálisis; debe decir: análisis.

En la página 84, en el tercer párrafo en la segunda línea dice: Somer et al; debe decir: Sommer et al.

En la página 101, en la décima primer cita en su segunda línea dice: Teis Profesional; debe decir: Tesis Profesional.

### **-:- TESIS PROFESIONALES -:-**

MECANOGRAFIA E IMPRESION

Campeche No. 156 - - - - Col. Roma

México, D. F. - - - - 06700

564-3954 ★ 584-8153