

34
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**“EVALUACION DE DOS FUENTES
NITROGENADAS EN EMBRIONES DE PINO
PIÑONERO (Pinus cembroides Zucc.) In Vitro**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
ANGEL DE LA ROSA MONTANTES

ASESOR: ING. AGR. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
" Evaluación de dos fuentes Nitrógenadas en embriones de Pino
PIÑONERO (Pinus cembroides Zucc.) In Vitro.

que presenta el pasante: De la Rosa Montantes Angel
con número de cuentas: 8422462-8 para obtener el TITULO de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 21 de Septiembre de 1995

PRESIDENTE	Biol. Elva Martínez Holguín	
VOCAL	Ing. Francisco Cruz Pizarro	
SECRETARIO	M.C. Otilio Acevedo Sandoval	
PRIMER SUPLENTE	Ing. Abel Rodríguez Bueno	
SEGUNDO SUPLENTE	Ing. A. José Manuel Ochoa Ibarra	

UAE/DEP/VAP/02

FALLA DE ORIGEN

D E D I C A T O R I A S

Con cariño y respeto a mis Padres: Moisés De La Rosa N. y Maria del Carmen Montantes B. de De La Rosa, por darme la vida y por depositar en mí toda su confianza y fe y que gracias a ello he logrado una meta más en mi vida.

A mis Hermanos: Rita, Fernando, Lucio, Carlos, Simón, Moisés y Ethel; por su apoyo, aliento y estímulo en todo momento. Los quiero con todo mi corazón.

A Angélica, porque gracias a Ti aprendí a vivir intensamente; y hacer posible lo imposible, por todo esto TE AMO.

Al Ing. Francisco Cruz Pizarro, por haber dirigido el presente trabajo con todo entusiasmo; por ser un profesor comprometido en la formación de mejores profesionistas y por haberme dado la oportunidad de compartir su valiosa amistad.

A la Biol. Elva Martínez Holguín, al Ing. Abel Rodríguez Bueno, al Ing. A. José Manuel Ochoa Ibarra, por sus acertadas y oportunas observaciones; así como sus alentadores comentarios sobre el presente trabajo y sobre todo por su gran profesionalismo y valiosa amistad.

A el M.C. Otilio Acevedo Sandoval por sus valiosos comentarios sobre el presente trabajo y por demostrarme que entre más conocimientos tengamos, más sencillos debemos ser.

A el Ing. Edgar Ornelas Díaz por su apoyo y estímulo, así como por su valiosa y sincera amistad de todos estos años.

A la M.C. Guadalupe Barral Zapata porque sembró en mí que la "Fe es creer en lo que no se ve; y la recompensa es ver lo que uno cree".

Al Ing. Salvador del Castillo Rabadán porque nos demuestra que el crear profesionistas no es sólo un trabajo, sino, es un sacrificio constante que lleva toda la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; por haberme recibido en su recinto y darme la oportunidad de superarme.

A el Pueblo de México, porque gracias a él tenemos la oportunidad de superarnos.

A el I.N.I.F.A.P., en especial a el Ing. Francisco Camacho Morfín por su ayuda desinteresada y sincera.

A mis compañeros de la 13^a generación, en especial a: Angeles, Araceli, Rosa, Lucía, Efigenia, Jaime R.R., Alejandro, Gerardo T.C., Sergio, Arturo G., Gustavo, Emilio, Jaime V.D., Juan, Gilberto, Fidencio, Martín, Adrián y Sebastián; por todos los momentos buenos y malos que pasamos juntos y que recuerdo siempre.

Y a todos aquellos que formaron parte en mi vida de estudiante...
GRACIAS.

ANGEL.

La presente investigación forma parte de la Catedra:
"Tecnología e Investigación en Micropropagación Vegetal".
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Octubre, 1995.

I N D I C E

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- OBJETIVOS.....	3
3.- HIPOTESIS.....	3
4.- REVISION DE LITERATURA.....	4
4.1.- Generalidades del pino piñonero.....	4
4.1.1.- Origen e importancia.....	4
4.1.2.- Clasificación Taxonómica.....	10
4.1.3.- Descripción Botánica.....	11
4.1.3.1.- Raíz.....	11
4.1.3.2.- Tallo.....	11
4.1.3.3.- Hoja.....	12
4.1.3.4.- Flor.....	13
4.1.3.5.- Fruto.....	13
4.1.3.6.- Semilla.....	15
4.2.- Distribución geográfica.....	21
4.3.- Requerimientos ambientales.....	25
4.3.1.- Clima.....	25
4.3.2.- Suelo.....	27
4.4.- Propagación.....	30
4.5.- Micropropagación en coníferas.....	38
4.6.- Embriogénesis.....	43
4.6.1.- Tipos de embriones.....	48
4.6.2.- Fases de los embriones.....	51
4.6.3.- Factores que afectan el desarrollo de los embriones <u>in vitro</u>	52
4.6.4.- Técnicas de rescate en embriones maduros.....	57
4.6.4.1.- Explante.....	60
4.6.4.2.- Medio de cultivo.....	67
4.6.4.2.1.- Sales inorgánicas.....	70
4.6.4.2.2.- Vitaminas.....	72
4.6.4.2.3.- Reguladores del crecimiento.....	73
4.6.4.2.4.- Carbohidratos.....	74
4.6.4.2.5.- Agua.....	76
4.6.4.2.6.- Agentes gelificantes.....	77
5.- MATERIALES Y METODOS.....	81
5.1.- Aspectos generales.....	81
5.1.1.- Ubicación del experimento.....	81
5.1.2.- Material vegetal empleado.....	81
5.1.3.- Diseño experimental.....	81
5.1.4.- Fecha de siembra.....	81
5.1.5.- Variables a evaluar.....	83
5.2.- Preparación del medio de cultivo.....	83
5.2.1.- Medio de cultivo.....	83
5.2.2.- Fuentes nitrogenadas.....	84
5.3.- Desinfección y siembra de los embriones.....	84
5.4.- Condiciones de incubación.....	86

6.- ANALISIS DE RESULTADOS.....	87
6.1.- Porcentaje de contaminación.....	87
6.2.- Porcentaje de sobrevivencia.....	89
6.3.- Desarrollo embrionario en peso.....	93
6.4.- Desarrollo embrionario en longitud.....	96
7.- CONCLUSIONES.....	100
8.- BIBLIOGRAFIA.....	101

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO

1	Valor nutricional de la semilla de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.....	8
2	Características externas de las semillas de <u>Pinus cembroides</u> Zucc.....	15
3	Distribución altitudinal de <u>Pinus cembroides</u> en México.....	23
4	Utilización de explantes en investigaciones <u>In vitro</u> en el Género <u>Pinus</u>	65
5	Diseño experimental utilizado en la presente investigación.....	82
6	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).....	84
7	Análisis de varianza del desarrollo embrionario en peso.....	94
8	Comparación de medias del desarrollo embrionario en peso mediante la prueba de Tukey.....	94
9	Análisis de varianza del desarrollo embrionario en longitud.....	98
10	Comparación de medias del desarrollo embrionario en longitud mediante la prueba de Tukey.....	98

FIGURA

1	Corte longitudinal de la semilla de <u>Pinus cembroides</u> mostrando su anatomía.....	20
2	Corte longitudinal de un embrión maduro de <u>Pinus</u> mostrando sus partes más importantes.....	20
3	Mapa de distribución de <u>Pinus cembroides</u> en México.....	24
4	Ciclo biológico de la regeneración en el género <u>Pinus</u>	31
5	Estadios en el desarrollo del embrión.....	51
6	Porcentaje de contaminación.....	88
7	Porcentaje de sobrevivencia.....	91
8	Porcentaje de vitrificación.....	92
9	Desarrollo embrionario en peso.....	95
10	Desarrollo embrionario en longitud.....	99

RESUMEN

La Micropropagación es actualmente una herramienta muy importante para la propagación vegetativa de varias especies, entre las cuales destacan las especies forestales. En la mayoría de las investigaciones que se llevan a cabo en el género *Pinus*, se han utilizado embriones como material vegetal, debido a su alta respuesta fisiológica a los diferentes factores que afectan el desarrollo *In vitro*. Dentro de los factores importantes tenemos la nutrición de los explantes, la cual es de suma importancia para un buen desarrollo de los mismos.

Pinus cembroides Zucc., es una especie forestal importante tanto en el aspecto ecológico, así como en el aspecto económico debido a que se desarrolla en una forma natural en zonas semiáridas, en donde la agricultura tradicional tiene pocas oportunidades de desarrollo por las limitantes que presentan estas zonas.

En base a lo anterior los objetivos planteados en la presente investigación son: conocer la respuesta del desarrollo *in vitro* de *Pinus cembroides* Zucc., a partir de embriones maduros; en dos diferentes fuentes nitrógenadas y así generar información en el campo de la Micropropagación para futuras investigaciones.

El material vegetal empleado son embriones maduros de *Pinus cembroides* Zucc. Los embriones maduros fueron inoculados en tubos de ensayo en medio de cultivo de Murashige y Skoog al 50% de su concentración original, utilizando la variable del estado físico del medio de cultivo (sólidos y líquidos), en los cuales se probó el efecto de dos fuentes nitrógenadas a 4 niveles cada una.

El mejor tratamiento para obtener un porcentaje adecuado de supervivencia así como un incremento en longitud de los embriones maduros, es el tratamiento 14 el cuál es un tratamiento de medio sólido y con una concentración de 5mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Para obtener un incremento en peso, se requieren de medios de cultivo ricos en Nitrógeno en la forma de Amonio como es el caso de los tratamientos 4 y 12, los cuales el primero es en medio sólido y el segundo en medio líquido respectivamente; los dos tratamientos constan de 20mM de NH_4NO_3 , respectivamente.

1.- INTRODUCCION

Los pinos estan representados por diversas especies que abundan en nuestro pais, entre las que destacan las especies pifioneras.

De los pifioneros, *Pinus cembroides* es el que ocupa mayor extension en ambas cadenas montañosas de la parte Norte del pais, alcanzando el limite Sur de su distribucion, en el Estado de Puebla, cerca de los 18° de latitud Norte.

La importancia de esta especie radica principalmente en su alto potencial adaptativo a condiciones tanto climaticas como edafológicas que otras especies del mismo genero no resisten. Además de que representa una fuente de ingresos economicos para los habitantes de regiones agricolas dificiles, principalmente de zonas secas y erosionadas del pais, al proveer de diversos productos entre ellos la recoleccion de su semilla (pifion). Esta especie provee a el mercado nacional el 90 % del total de pifiones comercializados en México.

Sin embargo poca atencion se le ha dado en México a los pifioneros, en relacion con otras coniferas.

La necesidad de investigar sobre los pinos mexicanos de valor ecológico y comercial es de alta prioridad.

Existen varias limitantes para la regeneracion natural de *Pinus cembroides*, empezando por el caracter errático en la produccion de conos, el alto indice de parasitismo por insectos en conos y semillas, tambien existe un alto indice de depredacion por roedores, aves, cabras y el mismo hombre, lo cual ocasiona que se

tenga poca semilla en el sustrato y por lo tanto su regeneración natural sea pobre.

Aunado a esto, la baja viabilidad de su semilla debido a su alto contenido de grasas, ocasionando una acelerada pérdida de su poder germinativo.

En la actualidad a pesar de los avances logrados en materia de propagación vegetativa en Pinus, los costos de producción de planta por vía agámica son superiores si los comparamos con los medios convencionales de propagación por semilla actualmente utilizados.

Es por esta razón que se debe recurrir a una técnica de propagación más eficiente para este tipo de especies.

El uso de la Micropropagación, es justificada cuando la multiplicación sexual de una especie, no es satisfactoria.

Sin embargo esta técnica nos obliga a realizar trabajos que nos ayuden a obtener el mejor medio de cultivo, así como determinar el mejor explante a utilizar, y así obtener una propagación más eficiente en todos los aspectos en estas especies forestales.

Por lo cual se establecen los siguientes objetivos:

2.- O B J E T I V O S

* Conocer la respuesta de desarrollo in vitro de Pinus cembroides Zucc., a partir de embriones maduros, con dos diferentes fuentes Nitrógenadas en medios sólidos y líquidos.

* Generar información en el campo de la Micropropagación sobre la especie Pinus cembroides Zucc., con el fin de obtener plantas completas en forma masiva.

3.- H I P O T E S I S

- Si el desarrollo embrionario in vitro se ve influenciado por la fuente que provee el Nitrógeno así como por el estado físico del medio de cultivo, entonces el desarrollo que presentarán los embriones serán favorables en algunos tratamientos.

4.- REVISION DE LITERATURA.

4.1.-Generalidades del pino piñonero

4.1.1.- Origen e importancia.

El origen de los pinos del mundo se remota a la Era Paleozoica antigua, Sub-era Paleozoica Superior, Periodo Pérmico, en que surgió la primera aparición de bosques de semillas (Gimnospermas) (Cuanalo, 1979).

Los pinos están representados por diversas especies que abundan en el país, y muchas otras que se encuentran ampliamente repartidas en diversas regiones del Hemisferio boreal (Passini,1982).

Rzedowski (1978), consigna que por lo menos 42 son especies mexicanas.

Lanner (1981) considera a México como un centro de diversificación del género *Pinus*, permitiendo que este género adopte distintas formas y en especial los piñoneros, ya que, México presenta la mayor concentración de especies piñoneras.

Es con *Pinus cembroides* que este grupo alcanza el límite Sur de su distribución, en el Estado de Puebla, cerca de los 18° de Latitud Norte (Eguiluz, 1982; Passini,1982; Zavarín y Snajberk, 1985).

De los piñoneros, *Pinus cembroides* es el que ocupa mayor extensión en el país, en ambas cadenas montañosas de la parte Norte (Eguiluz, 1978; Robert, 1978; Bailey y Hawksworth, 1979).

Pinus cembroides es endémico de Norteamérica (Phillips, 1985; Zavala, 1987).

Las comunidades de *Pinus cembroides* han sido deterioradas desde tiempos coloniales, a consecuencia de actividades mineras y agrícolas, entre otras (Beltrán, 1956 citado por Rebolledo, 1982; Rzedowski, 1978). Aunado a esto destacan la corta de árboles jóvenes y de ramas en fechas navideñas, así como el ramoneo y pisoteo de plántulas por animales domésticos (Rebolledo, 1982), otro problema importante es que tan pronto como las semillas se encuentran en el suelo más del 90 % con depredadas en unos 15 días; además la viabilidad y poder germinativo disminuyen por el alto contenido de grasas (Cetina, 1984).

Pinus cembroides tiene alto potencial adaptativo y resiste condiciones climáticas problemáticas (Passini, 1982; López, 1988; Montoya, 1990), de aquí su utilidad para fines de repoblación de áreas forestales, principalmente de zonas secas y erosionadas del país (Robert, 1977; Montoya, 1990). Esta especie toma mayor importancia, si se toma en cuenta que en México las zonas áridas y semi-áridas abarcan 797 millones de Km², los cuales equivalen al 40.5% de la superficie total de la República Mexicana, estudios recientes llevados a cabo por la Dirección General de Conservación del Suelo y del Agua, estiman que aproximadamente el 80 % de los suelos del país se encuentran bajo diferentes grados de erosión, con lo cual se realza la importancia ecológica de este tipo de especies (SARH, 1991).

Según la F.A.O. (citada por Montoya, 1990), el pifonero abarca en total un área mundial de unas 38,000 Ha.

La importancia de los bosques de pifoneros es muy amplia, pues

aunado a su gran valor ecológico como cubierta forestal, que evita la erosión y regula el régimen hidrológico por ejemplo, representa una fuente de ingresos económicos para los habitantes de esas regiones, al obtener los siguientes productos:

- * Maderas aserradas (laminadas y chapeadas para construir y para caja de empaque),
- * Destilación y productos extraídos de madera (resinas, aceites de pino y alquitrán),
- * Aserrín (harina de madera y madera en polvo para plásticos),
- * Pulpa de madera,
- * Productos celulósicos (plástico, rayón, celofán),
- * Manufactura de papel (absorventes, manila, mimeógrafo, sobres, etc.),
- * Artículos de papel (lijas, bolsas, cajas de cartón, carpetas, etc.),
- * Estacas para cerco,
- * Puertas,
- * Leña,
- * Carbón,
- * Arbolitos de Navidad,
- * Semillas comestibles,
- * Instrumentos musicales, y
- * Además el pastoreo que se practica en estos lugares (Cuanalo, 1979; Rebolledo, 1982; Mondragón y Olayo, 1985; Zavala, 1987; Benavides, 1987).

Poca atención se le ha dado en México a los pifoneros en relación con otras coníferas; esto se puede atribuir a las características propias de la especie, relativo a bajos incrementos en el volumen de su madera e irregularidades en la producción del pifon. Sin embargo, proporciona una cantidad considerable de leña para combustible así como, semillas para consumo y venta. Tales productos no cuantificables en volumen representan un complemento a la producción obtenida de las tierras de cultivo en zonas marginales de poblaciones humanas (Avila, 1985).

El *Pinus cembroides* es importante desde el punto de vista comercial por su semilla, más que por su madera. En México, las semillas comestibles de los pifoneros son objeto de recolección y comercio. *Pinus cembroides* proporciona el 90 % de la cosecha de pifones (Martínez, 1948 citado por Zavala, 1987; Egúiluz, 1978), siendo Nuevo León el principal proveedor (Rzedowski, 1978).

Las semillas de *Pinus cembroides* son de valor nutricional y tienen alto porcentaje de grasas (60 %). De las especies pifoneras analizadas, *Pinus cembroides* es la que posee las mayores cantidades de proteína en sus semillas, así como carbohidratos y también veinte aminoácidos requeridos, de los cuales siete de los nueve aminoácidos que son esenciales en el desarrollo humano se presentan en gran cantidad (Ver cuadro 1) (Lanner, 1981).

CUADRO 1.- VALOR NUTRITIVO DE LA SEMILLA DE *Pinus cembroides* Zucc.

ESPECIE	PORCION COMESTIBLE	HUMEDAD	PROTEINAS	GRASA	CHO's	FIBRA CRUDA	CENIZA
<i>Pinus cembroides</i> Zucc.	33.2%	2.73%	18.51%	59.96%	13.82%	1.79%	3.19%

FUENTE: Holkn y Shires (1948)

Rzedowski (1978), considera que *Pinus cembroides* es la principal especie proveedora de pifon en México, pero ha sido escasa e inadecuadamente aprovechada.

El *Pinus cembroides* adquiere una importancia cada vez más relevante, como el pino pifonero cuya semilla genera una alta actividad comercial en amplias zonas rurales del país especialmente en las de clima semi-árido (Lanner, 1981; Barrientos, 1983; Robledo *et al.*, 1985).

Su importancia aumentaría cuando se introdujera en huertos familiares, para la producción de pifones; si se considera además que es un arbolillo recomendable para decorar parques, jardines y campos deportivos, aprovechando en algunos casos, sus bajos incrementos en altura (Eguiluz, 1978).

Las semillas de los pinos aparte de ser usadas como alimento por el hombre y la fauna silvestre, constituyen la materia prima en los programas de producción de plantas destinadas a labores de reforestación, así como para el establecimiento de plantaciones

comerciales de alto rendimiento. En el país, a pesar de la gran diversidad de especies de pinos que contiene y dada la importancia de muchas de ellas dentro de la industria forestal, la información que se tiene al respecto de la biología de su reproducción por semillas es un tanto vaga y relativa, debido fundamentalmente a la falta de investigación, en este campo de la Dasonomía. Posiblemente esta falta de información en gran medida se deba a la dificultad que este tipo de estudios conlleva, debido sobre todo a la variación fenológica que presentan las especies de pinos a lo largo de su rango natural de distribución (Niembro, 1986).

Siendo los pifoneros el grupo de las especies más rústicas y útiles, es indispensable y urgente su difusión y promoción en las zonas ecológicas adecuadas de México, para lograr el uso de los suelos pobres forestales en formación y aumentar la producción forestal Nacional (Cuanalo, 1979).

Debido a la gran merma en su repoblación de las especies forestales que producen pifon comercial, sería recomendable promover la propagación vegetativa masiva de estas especies, para reforestar y extender las áreas de producción. Para realizar estas metas, y otras en el futuro, es necesario un método de propagación vegetativa rápido y eficiente, que permita multiplicar masivamente estas especies (Barrientos, 1983).

4.1.2.- Clasificación Taxonómica.

El problema en México de los pinos, especialmente de los piñoneros, es que su Taxonomía es aún poco conocida, esto es debido a su caracterización morfológica por su frecuente hibridación natural (Mirov, 1967 citado por Cetina, 1984).

El grupo de especies de *Pinus* conocido como piñoneros forma un taxón supraespecífico del género, constituido de 11 a 13 especies (Lanner, 1981; Passini, 1982; Eguiluz, 1985).

El pino piñonero es un grupo vegetal, por lo general de árboles agrupados dentro de la Subdivisión de las gimnospermas cuya característica especial consiste en presentar semillas sin ala (piñon) incluso dentro de un receptáculo formado por un eje leñoso a cuyo largo se insertan piezas membranosas, a veces leñosas, consistentes que las protegen y retienen denominado "cono" y que ha dado el nombre genérico a los vegetales que lo llevan (Coníferas) (Cuanalo, 1979).

Pinus cembroides fue clasificado por Zuccarini en 1832. Es una especie típica de México, pero aún sigue habiendo confusión en la definición de estas especies (Eguiluz, 1978; Rodríguez *et al.*, 1985).

Martínez (1979) citado por Cuanalo (1979), y Passini (1982) clasifican dos formas de *Pinus cembroides* siendo:

Pinus cembroides Zucc.

Pinus cembroides Edulis Voss.

Sin embargo la clasificación general de acuerdo a varios autores (Ruiz-Orozco *et al.*, 1958; Ellion *et al.*, 1980; Rodríguez *et al.*, 1985) es la siguiente:

REINO: Vegetal
SUBREINO: Embriobionta
DIVISION: Coniferophyta
CLASE: Coniferopsida
ORDEN: Coniferales
FAMILIA: Pinaceae
GENERO: *Pinus*
ESPECIE: *cembroides* Zucc.
NOMBRE CIENTIFICO: *Pinus cembroides* Zucc.

4.1.3.- Descripción Botánica.

4.1.3.1.- Raiz

Los pinos tienen un sistema radicular muy desarrollado lo que permite fijarse con solidez a la tierra y absorber suficiente agua aún en lugares relativamente secos. Sus raíces carecen de pelos absorbentes, pero se desarrollan, en substitución de los mismos, hongos que las envuelven y les forman micorrizas, las cuales desempeñan la función de los pelos radicales (Ruiz-Oronoz, 1958).

4.1.3.2.- Tallo

Las características morfológicas de la especie son muy variables; pero en términos generales es un árbol de 5 a 18 metros de altura, con una copa extendida redondeada o piramidal, de tronco corto con un diámetro que va de 20 cm. hasta 80 cm., este suele ser corto y el ramaje ralo. El ramaje de estos árboles es extendido, verticilado y a veces distribuido en forma irregular

debido a las masas y al grado de espesura dominante.

La corteza de los árboles de pifión es delgada, agrietada y dividida en placas cortas e irregulares, de color cenizo (Bailey y Hawksworth, 1979; Cuanalo, 1979; Passini, 1982; Eguiluz, 1985).

4.1.3.3.- Hoja

Las hojas del pifonero son aciculares de longitud media, delgadas y se desarrollan en grupos llamados fascículos que están sostenidas por una vaina membranosa al principio, que es caediza en 5 especies del grupo pifonero con excepción del *Pinus nelsonii*; sosteniendo el árbol con follaje siempre verde.

Las agujas u hojas están insertadas en los nudos, en haces de 2, 3 y 4 hojas, rara vez mayor número lo que adquiere cierto valor en el estudio sistemático de las especies por su constancia. La mayoría de las claves de determinación de las especies se basan en la posesión de 2, 3, o 5 acículas en el haz según las condiciones del medio ecológico.

La longitud de las agujas varía en el mismo pifonero de 2.5 cm. hasta 10 cm. en algunos pinos.

Las agujas son encorvadas, circunstancia que ayuda a identificar a los pifoneros.

En los pifoneros el borde de las hojas es entero sin dienteillos, o estos dienteillos son muy finos.

El color de las hojas es verde claro u oscuro, algo azul y la posición de ellas son esparcidas y colgantes.

La vaina es un estuche que sostiene a las agujas, está formado por escamas o bractéas enteras que al crecer las hojas, las vainas se desintegran como es el caso de los pifoneros (Cuanalo, 1979; Eguiluz, 1985).

4.1.3.4.- Flor

En el género Pinus los primordios florales tanto masculinos como femeninos se localizan en el mismo árbol, son plantas monoicas.

Los primordios de las flores masculinas se localizan en las ramas de la parte inferior de la copa, en los extremos de los brotes, integrando inflorescencias en forma de amento de color amarillo anaranjado, sobre las que van insertos en espiral flores estaminadas compuestas por dos anteras y un conectivo en forma de cuña.

Los amentos son numerosos y poseen una gran cantidad de polen en forma de polvillo amarillo que es diseminado por el viento.

Generalmente los primordios de las flores femeninas se encuentran en las ramas de la parte media y superior de la copa.

Las flores femeninas colocadas en la axila de una pequeña bractea producen 2 óvulos internamente cerca de la base, que contienen ápices en forma de cuerno que aprisiona el polen (Mirov, 1967 citado por Niembro, 1986; Cuanalo, 1979).

4.1.3.5.- Fruto

El fruto de los pifoneros es un cono. Se origina de la siguiente manera, después de la fertilización el conillo adquiere desarrollo y las escamas leñosas se cierran fuertemente

permaneciendo comprimidas unas con otras hasta la madurez y aprisionando en su interior las semillas.

El cono se forma en la primavera pero el polen depositado por el viento y cuya misión es fertilizar las flores pistiladas contenidas en su interior, apenas alcanza los óvulos en la primavera del segundo año y a partir de ese momento alcanza rápido desarrollo madurando sus semillas a fines de verano y el otoño (Ruiz-Oronoz et al., 1958; Cuanalo, 1979; Rodriguez et al., 1985).

En términos generales, el periodo de tiempo transcurrido entre la polinización y la maduración del cono y de las semillas es de unos 30 a 36 meses aproximadamente, es decir, se requieren de dos estaciones de crecimiento para que tome lugar la formación de las semillas (Mirov, 1967; Patiño, 1975 citados por Niembro, 1986; Zavala, 1987).

Sin embargo, no todos los óvulos que son polinizados llegan a ser fertilizados, ni todos aquellos que son fertilizados llegan a formar una semilla, debido a que un gran número de ellos abortan durante las diferentes etapas de su formación y desarrollo, causando grandes pérdidas en la tasa de producción de semillas (Niembro, 1986).

El cono o piña de los piñoneros, es redondo y cilíndrico, globosos de 5 a 6 cm. de diámetro, con longitudes variables de 3 a 6 cm., en grupos hasta de 5; por su posición son colgantes, liberales y casi sésiles, por su persistencia son deciduos y abren en la madurez, de color moreno anaranjado o rojizos, con pocas escamas.

Los principales elementos de un cono son los siguientes: Escamas o carpelos que están unidos al eje central leñoso; las escamas son de consistencia leñosa, llevando dos depresiones en las que van colocadas las semillas.

La parte expuesta al exterior del cono se llama apófisis de forma rómbica de color más claro que el resto del cono. La pequeña cicatriz en que termina el apófisis se llama umbo que es una pequeña prominencia; en el caso del pifonero el umbo es dorsal y transversalmente aquillado. Sus conos abren de Noviembre a Diciembre (Cuanalo, 1979; Rebolledo, 1982; Avila, 1985; Eguiluz, 1985).

4.1.3.6.- Semilla

Las semillas están colocadas en depresiones de las escamas, presentando las siguientes características (ver Cuadro 2):

CUADRO 2.- CARACTERISTICAS EXTERNAS DE LA SEMILLA DE
Pinus cembroides Zucc.

ESPECIE	FORMA	COLOR	LONGITUD	ANCHO	OBSERVACIONES
<i>Pinus</i>	SUBCILINDRICA	CAFE	DE	DE	ES UNA HUES ABULTADA
<i>cembroides</i>	O		9mm	7mm	EN LA PARTE SUPERIOR
Zucc	TRIANGULAR	OSCURO	A	A	Y DELGADA HACIA LA
			10mm	9mm	BASE, SIN ALA

FUENTE: ROBERT, 1978; EGUILUZ, 1978; CUANALO, 1979; EGUILUZ, 1985;
NIEMBRO, 1996; MONTOYA, 1990.

Un corte transversal de la semilla presenta la siguiente estructura:

* TEGUMENTOS

Tanto el embrión como el gametofito femenino se encuentran firmemente rodeados por los tegumentos, los cuales aparte de proteger a estas estructuras, controlan la absorción de agua y oxígeno durante la germinación (Kozlowski y Gentile, 1959; Mirov, 1967 citados por Niembro, 1986).

En la gran mayoría de las especies la testa como también se le llama a los tegumentos es bastante resistente a la acción mecánica y su grosor normalmente varía entre 0.3 y 0.6 mm. (Cuanalo, 1979; Niembro, 1986; Montoya, 1990).

La testa procede del desarrollo de los tegumentos del óvulo y constituye la protección exterior de las semillas, la testa está formada por dos capas diferenciadas (Besnier, 1989).

De acuerdo con Mirov (1967) citado por Niembro (1986), el tegumento externo en las semillas maduras se encuentra formado por hileras de células isodiamétricas, las cuales durante su crecimiento y desarrollo se han ido lignificando hasta adquirir una consistencia leñosa.

El tegumento interno es delgado y papiráceo debido a que gran parte de él fué absorbido por el gametofito femenino, durante su crecimiento y desarrollo. Por lo general este tegumento es de color castaño y se encuentra firmemente adherido al cuerpo del gametofito femenino (endospermo) (Cuanalo, 1979; Niembro, 1988; Besnier, 1989).

* GAMETOFITO FEMENINO

El gametofito femenino comúnmente llamado endospermo, es un tejido de consistencia carnosa con superficie completamente lisa, rodea completamente a el embrión y su color es rosado (Cuanalo, 1979; Niembro, 1988).

El endospermo carnoso esta constituido químicamente por diversas sustancias entre las que destacan principalmente las siguientes:

- Carbohidratos (almidones y hemicelulosas),
- Lípidos (aceites, grasas y ceras): Son sustancias muy heterogéneas, insolubles en agua pero solubles en éter, cloroformo y benceno. Los lípidos están constituidos por ácidos grasos entre los que destacan los ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, linólico, oleico, linolénico. Estas sustancias están presentes en forma de pequeños organelos subcelulares llamados esferosomas u oleosomas, mismos que son altamente distinguibles al ser vistos con el microscopio ordinario (Niembro, 1988), también se les denominan cuerpos grasos, localizados tanto en el endospermo como en los cotiledones y aún en el eje embrionario, cabe mencionar que los lípidos simplemente sustituyen al almidón como fuente de energía (Besnier, 1989).
- Proteínas: Las proteínas son sustancias sumamente complejas constituidas por cadenas de aminoácidos, los cuales tienen una importancia decisiva en la nutrición humana y animal; el contenido en aminoácidos esenciales define la calidad

nutritiva. La mayor parte de las proteínas contenidas en la semilla son metabólicamente inactivas con excepción de las enzimas y las nucleoproteínas (ADN y ARN) (Niembro, 1988; Besnier, 1989).

Osborne (1924) citado por Niembro (1988), clasificó las proteínas contenidas en las semillas en cuatro tipos diferentes conocidos con los nombres de albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas.

Estas proteínas están contenidas en el endospermo, encontrándose almacenadas en pequeñas estructuras subcelulares llamados cuerpos proteínicos o granos de aleurona, los cuales presentan una gran similitud en tamaño y forma con los granos de almidón (Niembro, 1988).

Estas sustancias son utilizadas por el embrión durante su germinación y posteriormente por la plántula para sostener las primeras etapas de su crecimiento y desarrollo, hasta que esté capacitada para elaborar sus propios alimentos a través de la fotosíntesis (Bewley y Black, 1978; Cronquis, 1981 citados por Niembro, 1988; Besnier, 1989).

* CAVIDAD EMBRIONAL

Es donde se aloja el embrión, siendo de color rosado blanquisco (Cuanalo, 1979).

* EMBRION

El embrión es una planta en miniatura; consiste en el eje embrionario y los cotiledones, cuya inserción divide en dos partes al eje embrionario (Besnier, 1989).

La parte superior o epicótilo, se compone de un corto tallito epicotileo y de la plúmula, la cuál es en si, las hojas embrionarias o los cotiledones de las gimnospermas, los cuales son delgados llegando a tener de 3 a 14 cotiledones por embrión. Los cotiledones funcionan como órganos de asimilación de las sustancias de reserva contenidas en la semilla. También protegen al ápice vegetativo. Por lo general este tipo de cotiledones presentan estomas y se encuentran capacitados para llevar acabo la fotosíntesis, permaneciendo en la plántula durante algún tiempo después de su germinación (Eames y Daniels, 1925; Holman y Robbins, 1946 citados por Niembro, 1988).

La parte inferior esta formada por la radícula, la cuál formará la raíz de la plántula (Bidwell, 1979; Cuanalo, 1979; Niembro, 1988). (Ver figuras 1 y 2).

Las semillas de *Pinus cembroides* sirven de alimento a roedores, pajaros y a el hombre, los cuales han desempeñado un importante papel en su distribución (Eguiluz, 1978).

Aproximadamente de 1,400 a 2,500 semillas recién cosechadas pesan 1kg. y su porcentaje de germinación es de alrededor del 60 % el cuál puede ser mejorado si se somete a estratificación (Rebolledo, 1982; Montoya, 1990).

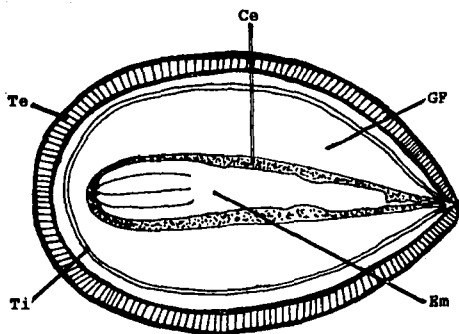


Figura 1.- Corte longitudinal de la semilla de *Pinus cembroides* mostrando su anatomía. Te; tegumento externo; Ti; tegumento interno; GF; gametofito femenino; Ce; cavidad embrional; Em; embrión.

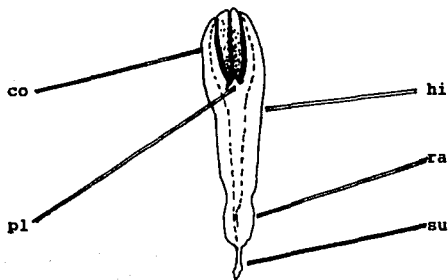


Figura 2.- Corte longitudinal de un embrión maduro de *Pinus* mostrando sus partes más importantes, su; suspensor; ra radícula; hi; hipocótilo; pl; plúmula; co; cotiledones. Fuente: Niembro, 1986.

4.2.-Distribución geográfica

El pino piñonero (*Pinus cembroides*) es uno de los de mayor distribución en México; forma masas puras dominantes de varias decenas de Km², pero también se puede encontrar mezclado con otras especies del mismo género (Eguiluz, 1978).

La distribución geográfica del piñonero en México, está comprendida dentro de los 19°00' a los 32°15' de Latitud Norte y 97°40' a los 116°15' de Longitud Oeste con respecto al Meridiano de Greenwich (Eguiluz, 1977; Cuanalo, 1979; Eguiluz, 1982; Passini, 1982; Zavarín y Snajberk, 1986).

Su área de distribución comprende casi todo el Norte y Centro de México (Martínez, 1948; Mirov, 1967 citados por Lopéz, 1988; Robert, 1978; Rzedowski, 1978), cubre las zonas bajas de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y penetra el Altiplano Mexicano y montañas aisladas del mismo (Ver Fig. 3) (Passini, 1982).

Casi siempre ocupa zonas de transición entre vegetación xerófila y mesófila (Rzedowski, 1978), comprendiendo áreas entre el desierto y áreas semi-áridas, es muy importante tomar esto muy en cuenta para establecer proyectos y plantaciones (Cuanalo, 1979). En lo que respecta a la altitud, existe un rango muy amplio en su distribución de acuerdo a varios autores (Ver cuadro 3).

La especie *Pinus cembroides*, se considera típica de México por su amplia distribución en forma natural en 19 Estados de la República Mexicana, dentro de los cuales Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Hidalgo y Zacatecas son los de mayor

población, sin embargo también están presentes en Baja California Norte, Baja California Sur, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Tlaxcala; pero también existe en forma cultivada en el Distrito Federal. Estando auscente en las costas de la República Mexicana con clima trópical, en las costas del Océano Pacífico y en las costas del Golfo de México (Eguiluz, 1978; Cuanalo, 1979; Eguiluz, 1982; Passini, 1982).

Por está razón se puede afirmar que se trata de una especie mexicana (Bailey y Hawksworth, 1979; Passini, 1982; Zavarin y Snajberk, 1985).

CUADRO 3.- DISTRIBUCION ALTITUDINAL DE *Pinus cembroides* Zucc.

A U T O R (E S)	AÑO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
ROBERT	1977	1,450 m.s.n.m.	2,700 m.s.n.m.
EGUILUZ	1978	1,350 m.s.n.m.	2,700 m.s.n.m.
RZEDOWSKI	1978	1,350 m.s.n.m.	3,000 m.s.n.m.
CUANALO	1979	1,800 m.s.n.m.	2,600 m.s.n.m.
EGUILUZ	1982	1,350 m.s.n.m.	3,000 m.s.n.m.
REBOLLEDO	1982	2,400 m.s.n.m.	2,700 m.s.n.m.
HERNANDEZ	1984	1,100 m.s.n.m.	3,650 m.s.n.m.
AVILA	1985	1,200 m.s.n.m.	3,650 m.s.n.m.
SNAJBERK y ZAVARIN	1986	400 m.s.n.m.	3,750 m.s.n.m.
ZAVALA	1987	400 m.s.n.m.	3,750 m.s.n.m.

FUENTE: Robert, (1977); Eguiluz, (1978); Rzedowski, (1978); Cuanalo, (1979); Eguiluz, (1982); Rebollo, (1982); Hernández, (1984); Avila, (1985); Snajberk y Zavarin, (1986); Zavala, (1987) .

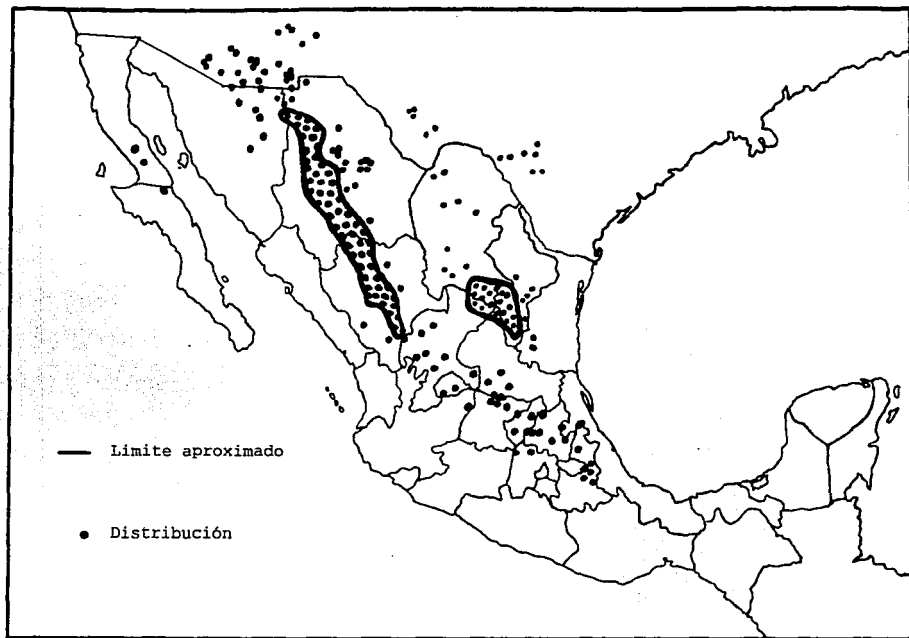


Figura 3.- Distribución de *Pinus cembroides* en México.

FUENTE: Cetina, 1984.

4.3.-Requerimientos ambientales

4.3.1.- Clima

La climatología preponderante en la zona de los pifoneros según la clasificación del Dr. C. W. Thornthwaite modificada por el C. Prof. Alonso Contreras Arias, es la siguiente simbología:

Cp B2b'

que interpretada es lo siguiente: Clima semi-seco con primavera seca, templado con invierno benigno, por tener una variación pluviométrica de 350 mm. a 700 mm. de altura que se distribuyen en lluvias durante cinco meses, de Junio a Octubre se distribuye el 85 % y en los meses de Diciembre a Febrero de cada año en forma de nevadas el 15 % restante. La estación seca abarca de Marzo a Mayo, reduciéndose a veces por algunas brizas esporádicas (Eguiluz, 1978; Robert, 1978; Rzedowski, 1978; Cuanalo, 1979; Rebolledo, 1982; Cetina, 1984; Avila, 1985).

Para el caso de la precipitación, aparentemente no presenta problemas serios para esta especie, pues se ha observado que Pinus cembroides resiste sequías que no toleran otras especies con las que convive, por lo cual se considera como especie adaptada a dicha condición (Robert, 1977; Benavides, 1987).

En lo que respecta a la temperatura, ésta es muy variable dependiendo de la ubicación de los sitios, normalmente varía desde los 7°C hasta los 40°C con promedios de 18°C, alcanzando mínimas extremas de -7°C y máximas de 42°C, a veces mayores (Eguiluz, 1978; Rzedowski, 1978; Passini, 1982).

Por esta razón es posible distinguir dos grandes zonas en la distribución de esta especie, en consideración a la variación de la temperatura: Una al Norte del Trópico de Cáncer (desde Coahuila y Durango hasta Baja California), donde la temperatura varía más de 10°C, y otra al Sur (Hidalgo, Veracruz, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí), donde la variación anual de la temperatura es menor de 10°C (Cuanalo, 1979; Passini, 1982).

Ecológicamente, la temperatura y la precipitación son los factores de mayor importancia para *Pinus cembroides* (Robert, 1977).

Sin embargo, la exposición del terreno también es un factor importante en la localización del pino piñonero, ya que prospera en aquellas áreas de la Sierra que reciben vientos secos del desierto, razón por la cual el área de dispersión natural de esta especie es la zona climática semi-árida y aún con precipitaciones pluviales muy escasas y tierras demasiado secas para otros árboles forestales. Las exposiciones predominantes de la zona de los piñoneros es en la Sierra Madre Occidental hacia el Este en donde preponderan los vientos secos de las planicies del Norte y Centro de la República Mexicana.

En la Sierra Madre Oriental la exposición predominante es hacia el Oeste por la misma razón del efecto de los vientos secos de las planicies del Norte y centro de la República Mexicana y en las zonas de los Estados del Centro de la República Mexicana como: San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo, Guanajuato, la exposición de los bosques de piñonero es hacia los lugares donde predomina la influencia de los vientos secos (Cuanalo, 1979)

4.3.2.- Suelo

Las poblaciones de *Pinus cembroides* no parecen tener relación con el pH del horizonte superficial del suelo y la naturaleza de la roca madre (Passini, 1982).

Robert (1977) menciona que en la Sierra Madre Occidental está especie crece sobre toda clase de rocas, desde sedimentarias hasta metamórficas.

Sin embargo, los suelos forestales en formación influyen determinadamente en la distribución y desarrollo de los bosques de coníferas, los cuales a su vez influyen en la conservación y formación de los suelos, así como en la conservación de las cuencas hidrográficas.

En la mayor superficie de distribución de *Pinus cembroides* en México, las rocas más abundantes son de andesita, conglomerado andesítico, andesita clásico, basalto y andesita ferromagnésiana, desarrolladas estas rocas sobre material volcánico, formado por varias corrientes andesíticas que se presentaron durante las etapas de glaciación del Pleistoceno.

Los suelos en su mayoría son complejos de montaña o amarillo-rojizo forestal y los litosuelos con las características generales siguientes: Texturas variables de migajón arenoso y arena arcillosa; de colores variables del blanco, gris, amarillo, anaranjado, café rojizo y rojo de estructura granular y microgranular de profundidad variable de 0.05m. a 1m. en los lomeríos y litosuelos; en las partes altas de las cimas es delgado rocoso y profundo en los valles (1m. a 2m.) de drenaje

bueno y muy bueno, humus pobre y variable de 5cm. a 10cm., pH que va de 4 a 8 (Robert, 1977; Eguiluz, 1978; Cuanalo, 1979; Rebolledo, 1982).

La fertilidad de estos suelos está condicionada a la existencia de Materia Orgánica (M.O.) en cantidades medias en el horizonte A y bajas en el horizonte B; Nitrógeno (N) en cantidades medias, Calcio (Ca) medio, Potasio (K) medio y Fósforo (P) medio.

La deficiencia en los suelos de N y P limita el crecimiento adecuado de la raíz y de la copa de los árboles.

La humedad disponible de los suelos donde prospera Pinus cembroides es baja y media en las laderas de las cimas y buena en los valles de los arroyos (Cuanalo, 1979; Rebolledo, 1982).

En términos generales un suelo que contenga un 40 % de humedad es adecuado para que germinen normalmente la mayoría de las semillas de Pinus cembroides (Baker, 1950 citado por Niembro, 1986).

La temperatura del suelo ejerce notable influencia en la germinación y en el crecimiento inicial de las plántulas. Los estudios de Kintigh (1949) citado por Niembro (1986), demostraron que a medida que aumenta la temperatura del suelo se incrementa la actividad metabólica del embrión. Temperaturas arriba de la óptima ocasionan que las reservas del gametofito femenino sean consumidas con mayor rapidez y no sean debidamente asimiladas por el embrión.

En consecuencia las plántulas resultantes son pequeñas y débiles. De igual manera las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica del embrión, lo cual trae por resultado que al final

de la germinación se encuentren proporciones del tejido nutritivo sin ser utilizado (Niembro, 1986).

Las características del suelo donde se depositan las semillas ejercen notable influencia tanto en la germinación como en el posterior crecimiento y desarrollo de las plántulas. Lo anteriormente dicho básicamente se debe a las diferencias de temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes, así como las facilidades que el suelo le brinde a la radícula para penetrar en su interior (Kozlowski, 1971 citado por Niembro, 1986), los suelos duros reducen la oportunidad para que la joven radícula encuentre una fisura por donde introducirse, motivo por el cual la mortalidad de las plántulas es mayor en estos suelos (Niembro, 1986).

4.4.- Propagación

La necesidad de investigar sobre los pinos mexicanos de valor ecológico y comercial es de alta prioridad. Conocer la regeneración natural para lograr un mayor entendimiento de los problemas presentados durante está etapa, puede ser un punto básico para un manejo más adecuado de estas especies (Musalem, 1984 citado por González, 1990).

En el ciclo biológico de la regeneración, el momento más crítico ha sido definido desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas, debido a que en esta etapa ocurre el mayor porcentaje de mortalidad. (Ver figura 4). Por lo anterior, si se quiere incrementar la cantidad de la regeneración del bosque, deben comprenderse las características básicas del crecimiento de las plántulas, sobre todo en las especies de coníferas donde los índices de mortalidad son altos (Daniel et al., 1982).

La regeneración de los piñoneros es importante ya que son de interés económico por el alto valor de su semilla y de la leña como combustible para los habitantes de la región donde prospera (Cetina et al., 1985).

Sin embargo, en el país los trabajos sobre la evaluación de la regeneración son escasos, como lo demuestra la poca literatura existente al respecto (González, 1990).

Cetina (1984) menciona que no hay estudios de regeneración de *Pinus cembroides*, en condiciones naturales. Esto ocasiona un desconocimiento de las principales características biológicas básicas y la respuesta ante estímulos ambientales (García y Gómez, 1987).

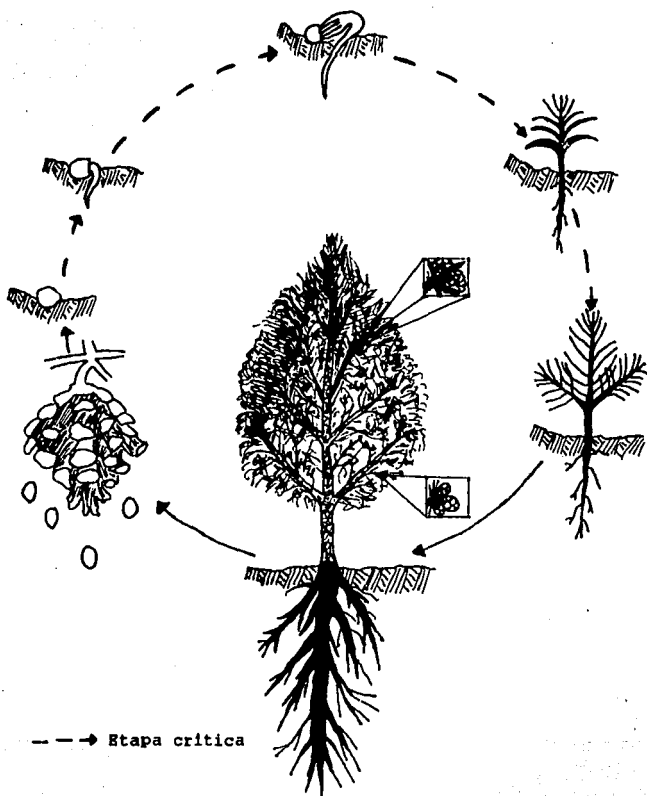


Figura 4.- Ciclo biológico de la regeneración en el género *Pinus*

Existen varias limitantes para la regeneración natural de Pinus cembroides, empezando por los árboles, que por lo general, no producen una cosecha abundante de semillas cada año, sino que existe una cierta periodicidad ciclica en la producción de las semillas, lo cual se manifiesta como una cosecha muy abundante en un año seguida de un periodo variable con baja producción, debido básicamente al carácter errático en la producción de conos (Daniel et al., 1982; Garcia et al., 1987; Zavala, 1987).

Ahora bien, el ciclo reproductivo de Pinus cembroides es largo y si se cuenta a partir del inicio y desarrollo de los primordios foliares hasta la maduración de las semillas en el cono, se requieren de 30 a 36 meses (Patiño, 1975 citado por Niembro, 1986; Zavala, 1987). Por lo que el ciclo reproductivo se prolonga casi dos años más que en cualquier otro género de coníferas (Stanley, 1957 citado por Niembro, 1986).

Aunado a esto, el parasitismo por insectos en conos y semillas es sustantivo. Son relativamente pocos los insectos que atacan las yemas reproductivas y los conos femeninos inmaduros de Pinus cembroides, pero muchos los que dañan o destruyen los conos, su daño general oscila entre el 40 y 50 % (Daniel et al., 1982; Flores y Díaz, 1985 citados por Garcia et al., 1987).

Del porcentaje anterior, el 62 % esta a cargo de Cantarina sp. y Conophorus cembroides, afectando a los conos unicamente; Leptoglossus occidentalis con un daño del 30 % a conos y semillas y Dioryctria albovitella que no se precisa daño (Cibrian-Tovar et al., 1986 citado por Garcia et al., 1987).

El tipo más común de daño a la semilla es el que resulta de la alimentación de las larvas de palomilla y gusanos en el interior de los conos y semillas (Daniel *et al.*, 1982).

Otra cuestión limitante es la depredación. Cetina (1984) y Zavala (1987), determinaron con respecto a la depredación, que el agente que actúa con mayor actividad son los roedores, después de las aves y por último las cabras. En los tres casos la semilla vana no fué consumida. En general se observó que el consumo de la semilla de *Pinus cembroides* es muy rápido por cualquiera de los agentes depredadores. Si además se considerará a otro depredador, el hombre, se entenderá por qué existe muy poca semilla en el sustrato (o en el banco de semillas) y escasa regeneración natural.

También la viabilidad de la semilla limita la regeneración natural de *Pinus cembroides*, las semillas recién caídas del pifonero tienen una alta viabilidad inicial (de 83 a 96%), pero está decrece rápidamente después de un año (Cetina, 1984).

Sin embargo las semillas germinan durante la primavera del año siguiente a su dispersión, aunque hay semillas que no germinan hasta el segundo o tercer año después de haber sido dispersadas (Mc Lomore, 1959 citado por Niembro, 1986).

Cetina (1984) obtuvo un 79.6 % de viabilidad y un 56 % de germinación en las semillas de *Pinus cembroides*, que es bajo, debido a su gran contenido de grasas y por la rápida descomposición de las mismas; se traduce esto en una rápida pérdida del poder germinativo.

El pifon almacenado en lugares apropiados, frescos, ventilados y secos, conserva su vitalidad hasta varios años (Cuanalo, 1979).

Se considerará que la semilla de *Pinus cembroides* no tiene problemas de germinación por efecto de su latencia (Cuanalo, 1979; Cetina, 1984), sino que los problemas de germinación son debidos a factores como su alto contenido de grasas (60 %), la falta de humedad durante la maduración parece provocar letargo en algunas ocasiones, durante la maduración, las temperaturas extremas pueden provocar letargo (Cetina, 1984; Besnier, 1989), así como la luz, el oxígeno y las características del suelo donde se encuentre la semilla (Waizel, 1970; Krugman *et al.*, 1974 citados por Niembro, 1986; Besnier, 1989).

Ahora bien, el establecimiento de las plántulas es otra etapa crítica en la naturaleza de *Pinus cembroides*. Su diseminación se efectúa principalmente por gravedad (Montoya, 1990), una vez colocada la semilla en el suelo, la germinación se lleva a cabo siendo epigea, es decir, los cotiledones se desarrollan sobre la superficie del suelo debido a la elongación del hipocotilo (Baker, 1950; Mirov, 1967; Kozlowski, 1971 citados por Niembro, 1986), el cual surge empujando los restos de la envoltura de las semillas. Cuando ésta se desprende aparecen las hojas cotiledonares en forma certicilada (Cuanalo, 1979).

La germinación no siempre toma lugar de manera normal sino que a veces se llegan a presentar irregularidades como: Germinación invertida, en la cual los cotiledones emergen primero que la radícula; formación de plántulas albinas, débiles o mucilaginosas; ruptura de la testa sin la emergencia del embrión.

Por lo general estos tipos de germinación producen plántulas que morirán al poco tiempo después de haber germinado (Kozlowski, 1971; Pollock y Ross, 1972, Wang, 1973 citados por Niembro, 1986).

El tiempo requerido para la germinación de las semillas se lleva a cabo de 12 a 30 días (Niembro, 1986).

Las primeras etapas del desarrollo de las plántulas básicamente están constituidas por el crecimiento primario. Este tipo de crecimiento da origen al tallo, a las semillas en la planta madura.

Antes de que finalice la primera estación de crecimiento, se forma en la plántula el cambium vascular a partir de las células del procambium. Una vez constituido el cambium vascular, toma lugar el crecimiento secundario. El crecimiento secundario o crecimiento en diámetro es el resultado de las divisiones de las células del cambium, para producir xilema hacia el interior y floema hacia el exterior.

A medida que la plántula incrementa su diámetro, la epidermis gradualmente va siendo reemplazada por la peridermis o corteza como vulgarmente se le llama (Esau, 1965 citado por Niembro, 1986).

Con la formación de la peridermis, el hipocotilo adquiere una consistencia leñosa y resistente, finalizando así el estado suculento de la plántula. A partir de este momento se termina un periodo durante el cual las plántulas son sumamente vulnerables a los daños provocados por damping-off, desecación, fuego, ataque de pájaros e insectos y pastoreo.

La mortalidad de las plántulas durante los primeros años de su vida, es el factor más importante que limita su establecimiento dentro de la comunidad (Niembro, 1986).

Sparhawk (1918) citado por Niembro (1986), demostró que aproximadamente el 80 % del total de las plántulas producidas mueren por diferentes causas en el curso del primer año de su vida. Durante el segundo año el 50 % del remanente del año anterior es eliminado. Al tercer año el 25 % de las plántulas que logra sobrevivir durante el segundo año perecen. En el transcurso del cuarto año las pérdidas llegan a ser de un 16 %, permaneciendo con vida aproximadamente el 6 % del total de las plántulas originalmente producidas.

La susceptibilidad de las plántulas a los cambios bruscos de temperatura, desecación, ataque de plagas y enfermedades, competencia por espacio, luz y nutrimentos, fuego, pastoreo y actividades de tala y extracción de madera, son las causas principales que originan su mortalidad en condiciones naturales (Baker, 1950; Fowells, 1965 citados por Niembro, 1986).

Las plántulas que lograron establecerse dentro de la comunidad, continuarán estando sujetas durante el resto de su vida a la presión de selección natural la cual viene a ser la fuerza última que determina qué individuos tendrán la oportunidad de llegar a la etapa de madurez y reproducirse normalmente en los bosques (Niembro, 1986).

En la actualidad a pesar de los avances logrados en materia de propagación vegetativa en Pinus, los costos de producción de

planta por vía agámica son superiores si se comparan con los medios convencionales de propagación por semillas actualmente utilizados. Básicamente las técnicas de reproducción asexual en los pinos están dirigidas hacia la propagación de fenotipos superiores destinados al establecimiento de huertos semilleros, cuya función es la de producir semillas genéticamente mejoradas, las cuales se utilizan para el establecimiento de plantaciones comerciales de alto rendimiento (Faulkner, 1975 citado por Niembro, 1986).

4.5.- Micropropagación en coníferas

La micropropagación es una técnica que consiste en el cultivo de células individuales o agregados celulares pequeños, tejidos, órganos aislados, embriones, polen, anteras y cultivo de plántulas enteras en un medio nutritivo con la finalidad de producir plantas en forma masiva (Bonga y Durzan, 1982; Muller y Krikorian, 1985 citados por Deysi, 1987; Go et al., 1993).

Los fundamentos que establecieron la micropropagación, fueron establecidos en 1838 por Schwann y Schleiden; al lanzar la teoría denominada de la Totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa (Margara, 1988; Pierik, 1990).

La micropropagación se aplicó inicialmente en plantas hortícolas y agrícolas, posteriormente se han empleado en especies forestales con fines de preservación y regeneración (Bonga, 1974; Konar y Nagmani, 1974; Winton y Huhtinen, 1976; Villalobos et al., 1983 citados por Deysi, 1987). Debido a los largos ciclos de las especies arbóreas, es fácil comprender el interés en micropropagarlas.

Deysi (1987) menciona que en México existen estudios de micropropagación en especies arbóreas con *Cedrella odorata* (Enriquez del Valle, 1985), *Pinus patula* (Vargas, 1982), *Pinus caraibaea* (Robledo y Villalobos, no publicado), *Pinus maximartinezii* (Robledo y Villalobos, no publicado).

La micropropagación se da a través de un proceso morfogénico que involucra dos mecanismos; la organogénesis y la embriogénesis (Deysi, 1987).

El uso de la micropropagación es justificada cuando la multiplicación sexual de una especie no es satisfactoria (no se forman semillas, o se forman muy pocas, las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa), entonces se suele buscar la multiplicación vegetativa (Pierik, 1990).

La micropropagación es extensamente usada para árboles forestales en la actualidad (Cornu, 1990).

El cultivo in vitro de células, tejidos y órganos vegetales es una técnica con gran potencial en la propagación vegetativa de individuos seleccionados de especies forestales, así como en su mejoramiento genético (Barrientos, 1983).

Dentro de las ventajas del cultivo in vitro, existe un considerable ahorro de espacio, altos porcentajes de multiplicación cuando se necesite y una casi completa eliminación de patógenos (Henshaw et al., 1980 citado por Barrientos, 1983).

El cultivo de tejidos vegetales es una importante herramienta para la micropropagación de especies anuales y bianuales. En la actualidad, las firmas comerciales más importantes del mundo, multiplican clones en forma masiva en ornamentales, hortalizas y frutillas. Comparativamente, la micropropagación de especies perennes no ha progresado al mismo ritmo ya que se ha encontrado que los tejidos u órganos más diferenciados son poco sensibles a las condiciones in vitro (Villalobos et al., 1983). Sin embargo, la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en coníferas y otras especies leñosas, ofrecen una alternativa valiosa para la propagación clonal de árboles "élite", así como

un modelo experimental para estudios morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos (Villalobos, 1984; Robledo *et al.*, 1985 citados por Orea y Villalobos, 1985).

El cultivo de tejidos vegetales abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo bajo condiciones asépticas de las diferentes partes de la planta.

Los aspectos fundamentales del cultivo de tejidos vegetales son:

- A).-El aislamiento de fragmentos de tejidos u órganos (explantos) de una planta completa, excluyendo todos los micro-organismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas (insectos y nematodos).
- B).-Proveer a estos explantes de un medio ambiente apropiado al optimizarse las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales que permitan expresar su capacidad morfogénética.
- C).-Ocurren a micro-escala, sobre una superficie relativamente pequeña (López, 1985a; Pierik, 1990).
- D).-Ahorro de tiempo en la propagación. Si propagáramos el material seleccionado vía cultivo de tejidos, el tiempo se disminuiría drásticamente a 2 o 3 años, obteniendo plántulas para establecerse en tierra, además sería sumamente útil para la propagación vegetativa de árboles difíciles de obtener por los métodos convencionales y se reduciría hasta en un 75% el tiempo para obtener plántulas destinadas a la reforestación o plantaciones comerciales (Libby, 1974; Winton y Huhtinen, 1976; Rediske, 1978; Sommer y Brown, 1979; Mc Keand, 1981 citados por Barrientos, 1983).

Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos in vitro; por ejemplo, los tejidos de gimnospermas son más difíciles de cultivar que los de angiospermas (Ochoa, 1985) y también las especies herbáceas son más fáciles de clonar in vitro que las especies leñosas. (Pierik, 1990).

Aún cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a 1860-1861, años en que Sacko (1860) y Knops (1861) descubrieron que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos orgánicos e inorgánicos. El resultado de estas observaciones fué la elaboración de una sustancia nutritiva (solución Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo (Villalobos, 1985).

El primer informe de cultivo in vitro en especies leñosas data de 1924 cuando Schmidt cultiva embriones de coníferas, siguiendo Brunner en 1932 al cultivar embriones de pinos sin el megagametofito (Villalobos, 1985). Después siguió Gautheret en 1934 cultivando tejidos de cambium de diferentes géneros de especies maderables y logra mantener algunos de ellos en crecimiento por tiempo indefinido (Ola-Adams, 1978 citado por Deysi, 1987; Vargas, 1982).

En 1936 La Rue, cultiva in vitro embriones removidos de semillas inmaduras de Pinus resinosa, Picea canadiensis, Pseudotsuga menziessi, Thuja occidentalis y Thuja canadiensis, obteniendo plántulas de apariencia normal. Posteriormente Gautheret en 1940

señala el crecimiento de yemas a partir de tejido cambial de Ulmus campestris cultivado en medio aséptico. Morel en 1948 indica el cultivo de varias especies de angiospermas, así como de Pinus strobus en estudios de Patología (Sommer y Brown, 1979 citados por Vargas, 1982).

A pesar del relativo fracaso de los primeros intentos de cultivar in vitro tejidos de especies leñosas, estos esfuerzos fueron el inicio del cultivo de tejidos de árboles en forma extensiva, tratando de mostrar las potencialidades que esta técnica ofrece (Vargas, 1982).

Después de estos trabajos, el cultivo de tejidos y órganos se han utilizado de manera más generalizada de tal forma que a la fecha se reconoce a esta técnica como una herramienta de gran potencial para preservar y regenerar bajo condiciones asépticas el componente genético de aquellas especies forestales que producen semillas de viabilidad corta, o bien que presentan problemas para propagarlas por los métodos y técnicas convencionales (Ola-Adams, 1978 citado por Deysi, 1987).

Hasta 1977 más de 95 especies de gimnospermas pertenecientes a 9 familias y 25 géneros, se han colocado en cultivos estériles; de éstas, 87 son miembros de las coníferas y casi la mitad corresponden al género Pinus (Durzan, 1980 citado por Vargas, 1982; Barrientos, 1983).

4.6.- Embriogénesis

La embriogénesis es un proceso por el cual un embrión se desarrolla a partir de una célula huevo, o asexualmente a partir de una o un grupo de células, hasta la formación bipolar de un embrión (Winton, 1978 citado por Deysi, 1987; Pierik, 1990).

Existen dos tipos de embriogénesis:

A).- Embriogénesis sexual o cigótica.

La embriogénesis cigótica, o normal, tiene como punto de partida el cigoto (con $2n$ cromosomas) resultante de la fusión de los gametos masculinos y femeninos (con n cromosomas) procedentes de la meiosis (Margara, 1988).

Se ha considerado que el embrión cigótico se origina a partir de la célula huevo del saco embrionario una vez que ha sido fertilizado por el núcleo haploide masculino; es decir, una vez que el cigoto ha sido formado.

Para formar el embrión, generalmente el cigoto se divide transversalmente en relación al eje micrópilo chalaza. La segunda división puede variar en orientación. Generalmente la célula próxima al micrópilo se divide transversalmente y la distal puede dividirse transversal, oblicua o longitudinalmente, variando al momento de división de estas células según la especie (Esau, 1972).

Todas las divisiones celulares posteriores forman filas celulares que más tarde sufrirán la primera diferenciación en el cuerpo principal o embrión propiamente dicho, y suspensor,

que es un agregado celular en forma de pedúnculo que mantiene unido al embrión y al saco embrionario en la zona micropilar; aunque no todas las especies presentan la formación del suspensor.

La segunda división que ocurre en el cuerpo del embrión, es la de los polos distal, más lejano de la región micropilar, y la proximal, más cercano a la región micropilar (Wardlaw, 1955 citado por Esau, 1972). Antes de la aparición de los cotiledones hay un engrosamiento de la parte distal del embrión, dado por las divisiones periclinales que ocurren en él (Norstog, 1961 citado por Esau, 1972).

La organización del sistema de meristemas primarios (procambium, protodermis y meristemo principal) empiezan mucho antes de que el embrión alcanza su tamaño final. La protodermis se inicia por divisiones periclinales a lo largo del cuerpo del embrión y no en el suspensor. El procambium se organiza antes que los cotiledones y, a medida que esto sucede, continúan hacia ellos para unirlos con el eje embrionario (Esau, 1972).

La secuencia de división y destino de las células varía incluso dentro de la misma especie, siendo la forma del embrión resultado de la interacción entre óvulo-embrión principalmente a nivel nutricional y espacio (Norstog, 1961 citado por Esau, 1972). Sin embargo, otros autores (Wareing y Graham, 1976 citados por Carbajal, 1986), han considerado que los caracteres del embrión cigótico están determinados por

los codones de proteína de tres genomas: el del padre, el de la madre y el del cigótico, difiriendo de los sistemas somáticos en los que interviene un sólo genoma.

Una vez que el embrión ha llegado a su estado maduro, se le considera como una estructura bipolar, por presentar meristemas que crecen en sentido opuesto (meristemo apical de raíz y meristemo apical del vástago). En su mayor parte, las células están poco diferenciadas, aunque en su parte central del eje hay tejido vascular, o procambium, que une a los dos meristemas. El meristemo apical de raíz está protegido por una capa celular denominada caliptra (Esau, 1972).

B).- Embriogénesis somática

La embriogénesis asexual o somática es un proceso morfogénico que comprende el desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de la fusión gamética (Ammirato, 1983 citado por Carbajal, 1986; Winton, 1978 citado por Deysi, 1987; Margara, 1988; Pierik, 1990).

Este proceso puede presentarse de manera natural, en la poliembrionia, como en varias Rutaceas, principalmente en Citrus spp., y en mango; o puede inducirse in vitro a partir de varios explantes o tejidos (Carbajal, 1986).

La embriogénesis somática provocada experimentalmente en cultivo in vitro, se realiza a partir de células somáticas (diploides); tiene su origen, pues, en la mitosis (Margara, 1988).

Se considera embriogénesis somática in vitro a aquel proceso regenerativo que presenta una estructura primaria bipolar, o sea, que presenta cotiledón y radícula, y que no está conectado por medio de tejido vascular con el explante o agregado celular (callo) en cultivo (Winton, 1978 citado por Vargas, 1982; Street, 1976 citado por Carbajal, 1986; Pierik, 1990). Para que se consideré embriogénesis somática, también debe de pasar por los estadios globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Street, 1976 citado por Carbajal, 1986).

Se pueden distinguir dos tipos diferentes de embriogénesis somática:

A').- DIRECTA: En este caso el embrión se origina directamente, a partir de una célula o tejido, sin que se produzca una formación previa del callo.

B').- INDIRECTA: En este tipo de embriogénesis, primero se forma un callo, a partir del cuál se forman después los embriones (Sharp et al., 1982; Ammirato, 1983; Evans et al., 1981; Kohlenbach, 1985; Ammirato, 1986 citados por Pierik, 1990; Winton, 1978; Hartman y Kester, 1983 citados por Deysi, 1987). El embrión crece siempre del agregado de células hacia la atmósfera (Carbajal, 1986).

En la actualidad el interés de reproducción esta enfocado sobre nuevos aprovechamientos de los métodos in vitro incluyendo embriogénesis somática y cultivo de protoplastos (Cornu, 1990).

La embriogénesis somática es considerada como una eficiente forma de multiplicación clonal, porque es capaz de producir

un gran número de plantas uniformes en un tiempo relativamente corto (Lozoya, 1985; Rao *et al.*, 1985 citados por Deysi, 1987).

La embriogénesis ofrece mayores posibilidades que la organogénesis como un método práctico para la propagación masiva de plantas por cultivo *in vitro* (Durzan, 1980; Herman, 1984 citados por Deysi, 1987). Debido a esto, Becwar *et al.*, (1987) han llevado a cabo trabajos sobre embriogénesis somática para caracterizar sistemas *in vitro* para varias especies de coníferas.

Sin embargo, el número de éxitos en embriogénesis somática de especies arbóreas es limitado, en comparación con las plantas herbáceas (Deysi, 1987). Un ejemplo muy claro es la obtención de estructuras somáticas muy parecidas a embriones provenientes de células, utilizando protoplastos, se ha logrado la embriogénesis celular somática en *Pinus taeda*, y *Pseudotsuga menziesii* por Durzan (1979) citado por Barrientos, 1983.

Ahora bien, la embriogénesis *in vitro* esta confinada a los tejidos derivados de la primera generación de meristemas, es decir, los que forman el embrión (Bonga, 1980 citado por Vargas, 1982).

En las coníferas el clonado partiendo de callos inmaduros producidos a partir de embriones, así como la formación de vástagos axilares, resulta fácil (Hu y Wang, 1986 citados por Pierik, 1990).

Las plantas juveniles regeneran vástagos adventicios con relativa facilidad. Por ejemplo, en el caso de las gimnospermas, la formación de vástagos adventicios generalmente sólo es posible con embriones, plántulas o porciones de plántulas y no con plantas adultas (David, 1982; Anónimo, 1984 citados por Pierik, 1990).

4.6.1.- Tipos de embriones

Existen dos tipos de embriones:

A).- Embriones cigóticos

El embrión proviene del desarrollo del cigoto, quién resulta de la fecundación de la oosfera en el saco embrionario por uno de los núcleos espermáticos procedentes del grano de polen, representando el principio de una nueva generación esporofítica de las plantas (Raghavan, 1977 citado por Manzo, 1991; Beuley y Black, 1978 citados por Niembro, 1988; Margara, 1988; Niembro, 1988).

El cigoto presenta tres características principales:

- 1).- Proviene de la fusión de dos gametos, macho y hembra (con n cromosomas).
- 2).- Es una célula libre que presenta un desarrollo independiente, no estando sometida a las interacciones de las células integradas en un tejido.
- 3).- El medio del joven embrión proveniente del cigoto está constituido por el albumen, que puede aportar sustancias tróficas y también reguladores del crecimiento (Margara, 1988).

El embrión normal salido del desarrollo del cigoto está caracterizado además de por su origen, por su morfología y su desarrollo.

Así, una vez que el embrión ha completado su desarrollo, lo cuál toma lugar aproximadamente de 7 a 8 meses después de la fertilización, este es un eje polarizado, estando formado por un verticilio de cotiledones u hojas embrionarias, cuyo número varía notablemente entre y dentro de la especie. Los cotiledones rodean a una estructura cónica formada por tejido meristemático la cuál recibe el nombre de plúmula o epicótilo. Esta estructura da origen tanto al tallo de la plántula como a sus hojas primarias. Debajo de los cotiledones se encuentra el hipocótilo, el cuál es una región de transición entre el tallo y la raíz. En la región inferior al hipocótilo se localiza la radícula, la cuál está formada por tejido meristemático. La radícula dará lugar a la raíz primaria de la plántula

En el extremo radicular del embrión de las semillas es posible encontrar los remanentes de las células del suspensor, las cuales se presentan formando un delgado filamento enrollado (Niembro, 1986; Margara, 1988).

En *Pinus cembroides*, el embrión presenta una forma lineal o ligeramente curvo, cilíndrico, de color crema y colocado longitudinalmente en el centro de las semillas. El embrión así constituido se encuentra inmerso en el tejido del gametofito femenino, el cual a su vez está completamente rodeado por los tegumentos del óvulo, los cuales se han tornado gruesos y leñosos (Niembro, 1986).

B).- Embriones somáticos

En la literatura, los embriones somáticos son denominados de diferentes formas; estructuras de tipo embrionario, embriones vegetativos o adventicios, embrioides, pseudo-embriones; y al proceso de su formación se le denomina embriogénesis adventicia, asexual o somática (Sharp et al., 1982 citados por Pierik, 1990; Margara, 1988).

Los embriones somáticos se originan a partir de células somáticas (con 2n cromosomas), las cuales pueden producir estructuras comparables a los embriones.

Los embriones somáticos poseen una estructura bipolar de la que los dos polos meristemáticos desarrollan, respectivamente el hipocótilo o plúmula, el cuál dará origen al tallo, y la radícula la cuál formará la raíz (Raghavan, 1977 citado por Manzo, 1991; Margara, 1988).

En condiciones in vitro, el endospermo es sustituido por el callo y el medio de cultivo (Carbajal, 1986).

Las diferentes estructuras del embrión realizan funciones específicas que siguen un modo de desarrollo predeterminado, el cual, en las investigaciones in vitro dependen de la interacción entre las diferentes partes del embrión durante su germinación, y los potenciales morfogenéticos de las diferentes partes del mismo (Bhojwami y Razdan, 1983).

4.6.2.- Fases de los embriones

Dentro del desarrollo embrionario, ya sea cigótico o somático, el embrión debe pasar por los siguientes estadios principales:

- A).- ESTADIO GLOBULAR: Se le denomina así por la forma de globo, la cual se origina por una acelerada división celular.
- B).- ESTADIO DE CORAZON: Los dos lóbulos del estadio de corazón forman los cotiledones dando la apariencia acorazonada.
- C).- ESTADIO DE TORPEDO; En este estadio el embrión tiene una forma bipolar más definida.
- D).- ESTADIO COTILEDONAR; En esta forma se observa claramente la plúmula con sus respectivos cotiledones y la radícula, el desarrollo del embrión ha finalizado en esta etapa (Ver Fig.5). (Pierson *et al.*, 1983 citado por Carbajal, 1986; Esau, 1972; Bidwell, 1979; López, 1985c; Deysi, 1987).

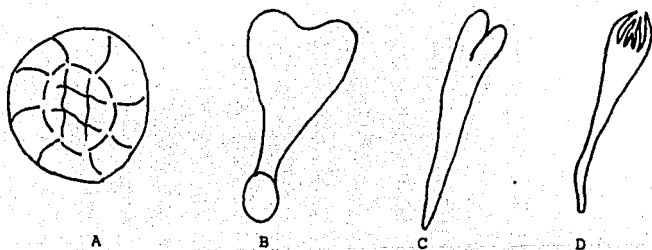


FIGURA 5.- Estadios en el desarrollo del embrión.
FUENTE: Deysi, 1987; Bidwell, 1979.

4.6.3.- Factores que afectan el desarrollo de los embriones in vitro

El crecimiento de un embrión in vitro hasta el desarrollo de una planta viable, esta determinado por diversos factores, entre los que destacan:

A).- GENOTIPO: La constitución genética de la planta, es muy importante, porque en algunas especies vegetales los embriones son difíciles de cultivar, mientras que en otras resulta fácil.

B).- ESTADO DE DESARROLLO DEL EMBRION EN EL MOMENTO DEL AISLAMIENTO.

C).- LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA MADRE.

D).- COMPOSICION DEL MEDIO NUTRITIVO: Los embriones inmaduros tienen unas necesidades mucho más críticas, en cuanto a la composición del medio nutritivo, que los embriones maduros. Sin embargo, tanto los embriones maduros como los inmaduros necesitan nutrientes, de los cuales la influencia de la aportación de Nitrógeno y la forma bajo la cuál debe ser suministrado ha sido muy discutida, aunque se ha encontrado que el Nitrógeno en forma de ion amonio estimula fuertemente la embriogénesis en comparación con el Nitrógeno en forma de Nitrato. También se ha encontrado la necesidad de una alta concentración de azúcares en el medio, que ayuda a la formación de raíces adventicias en plantas leñosas. Otro componente importante es el agar, ya que se ha detectado una condición fisiológica llamada vitrificación, esta aparece

especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar. Tradicionalmente la vitrificación ha sido definida por la sintomatología visual que presenta el explante tal como: apariencia suculenta, vidriosa y remojada, así como el crecimiento irregular del mismo. La vitrificación es el resultado de un incremento de agua en el protoplasma celular; ocasionando de acuerdo a estudios histoquímicos, una baja producción de cutinas, pectinas y celulosas, esto da como resultado que las células no se lignifiquen normalmente. Esto ocasiona que el tejido entre en una etapa de tensión por la falta de aeración, lo cual ocasiona una producción de niveles altos de etileno, dando una formación de plantas vidriosas y en algunos casos la necrosis del tejido. También es importante la aplicación de sustancias orgánicas como vitaminas, reguladores del crecimiento, entre otras. (Raghavan, 1966 citado por Manzo, 1991; Vasil y Vasil, 1972 citados por Carbajal, 1986; Narayanaswany, 1977 citado por Vargas, 1982; Anónimo, 1978a; Debergh, 1983; Ziv y Halevy, 1983; Ziv, 1986 citados por Pierik, 1990; Monnier, 1978; Bhojwani y Razdan, 1983; Lozoya, 1985; Carbajal, 1986; Margara, 1988; Pierik, 1990; Debergh, *et al.*, 1991; Litz, 1991).

Cabe mencionar que la diferenciación del embrión se lleva a cabo cuando se presentan los valores más bajos en cuanto a potencial osmótico en el medio de cultivo (Carbajal, 1986; Litz, 1991).

E).- OXIGENO: Se trata de un factor importante, siendo en algunas ocasiones, las necesidades de oxígeno de los cultivos de embriones, superior a las concentraciones que normalmente se encuentran en el aire (Minnier, 1980 citado por Pierik, 1990).

F).- LUZ: La luz tiene una mayor influencia sobre la regulación y mantenimiento de muchos desarrollos y procesos morfogénéticos (Vargas, 1982; Lozoya, 1985; Pierik, 1990; Ellis y Webb, 1993).

Por ejemplo, Guptan y Durzan (1986) encontraron que en la oscuridad los embriones se alargan y forman numerosos cotiledones en un repetido y exacto proceso poliembionario. En cambio Bronson y Dixon (1988) tuvieron éxito al aumentar el fotoperiodo, logrando obtener vástagos adventicios en cotiledones de *Pinus elliottii* Engelm.

Haissig (1965) citado por Vargas (1982), indica que la presencia de la luz permite una utilización más efectiva del azúcar por parte del embrión.

Vargas (1982) señala que para la formación de embriones somáticos, por su parte, requieren de intensidades luminosas muy elevadas (10,000 a 15,000 lux). Aunque algunos autores (Winton y Hohtinen, 1976 citados por Vargas, 1982; Ellis y Webb, 1993), han logrado obtener formación de embrioides a intensidades luminicas de 500 a 6,000 lux en especies de coníferas.

En lo que respecta a el fotoperiodo, se recomiendan fotoperiodos largos de 16 a 18 horas e inclusive de 24 horas (Cheng, 1975; Sommer et al., 1975; Winton y Huhtinen, 1976 citados por Vargas, 1982; Hartman y Kester, 1978; Pierik, 1990; Ellis y Webb, 1993).

A veces los embriones aislados necesitan ser cultivados en la oscuridad, durante 7 a 14 días, pudiendo luego ser transferidos a la luz, para permitir la formación de clorofila (Smaal, 1980 citado por Pierik, 1990).

G).- TEMPERATURA: La temperatura depende de la especie vegetal que se usa. Normalmente se utiliza una temperatura relativamente alta (22°C a 28°C) para el crecimiento del explante (Narayanaswamy y Norstog, 1964 citados por Manzo, 1991; Pirik, 1990; Ellis y Webb, 1993). Sin embargo en algunos embriones específicos se suele utilizar un tratamiento de frío (4°C) el cuál puede ser necesario para romper la dormancia (Shabde-Moses y Murashige, 1979 citados por Manzo, 1991; Pierik, 1990).

H).- CONTAMINACION: Otro factor limitante para el desarrollo In Vitro, es la contaminación la cual puede ser ocasionada por dos organismos: Hongos y bacterias; los cuales afectan el crecimiento y desarrollo del explante utilizado. La contaminación en el cultivo de tejidos puede originarse por dos fuentes, ambas son por el transporte de microorganismos, los cuales existen tanto en la superficie como dentro de los tejidos del explante (Campbell, 1985 citado por Debergh et al., 1991).

Es difícil obtener información de las pérdidas que ocasiona la contaminación en la Micropropagación, debido a razones comerciales; aunque se persiguen porcentajes bajos de contaminación (menos del 10%), ya que, entre más alto sea el porcentaje, más se eleva el costo por planta obtenida (Wright, 1986; Long *et al.*, 1988; Leifert *et al.*, 1989a citados por Debergh *et al.*, 1991).

Todos los factores señalados anteriormente no actúan de manera aislada, sino en interacción, lo cual manifiesta diferentes requerimientos externos que pueden ser aplicados a la embriogénesis *in vitro* (Carbajal, 1986).

El factor más importante varía con las especies a propagarse (Van den, 1991).

Se requiere más información acerca de los factores que influyen el crecimiento de los embriones (Orea y Villalobos, 1985). Esto ha originado que el conocimiento de cómo se induce la regeneración de plantas *in vitro* sea altamente empírico, por lo que la manipulación de las condiciones fisiológicas del explante, del medio de cultivo y las condiciones ambientales, hasta que se logra el éxito de la regeneración, deban ser estudiadas para su mejor comprensión (Leung, 1985).

4.6.4.- Técnicas de rescate en embriones maduros

El cultivo de embriones maduros consiste en el aislamiento y crecimiento in vitro, en condiciones estériles de un embrión maduro, fuera del resto de los tejidos de la semilla, con el fin de obtener una planta viable (Pierik, 1990).

El origen se remonta a los experimentos de Hannig en 1904 quién trabajó con embriones en diferentes estados de desarrollo de Crucíferas, utilizando medios de cultivo bastante simples a base de sales minerales y sacarosa, concluyendo que la germinación de los embriones ocurría normalmente aún cuando estos estuvieran inmaduros (Shabde-Moses y Murashige, 1979; Bhojwani y Razdan, 1983; López, 1985c; Hu y Wang, 1986; Pierik, 1990; Ramming, 1990).

Después prosiguieron más intentos; en 1924 Schmidt utilizó embriones de coníferas; el fisiólogo americano P. White en 1930 desarrolló medios en los cuales los embriones en el estadio de corazón se cultivaban con éxito. Pero en tanto que los embriones más avanzados crecían en medios relativamente simples con nutrientes inorgánicos y sacarosa, ya para 1932 Brunner intentó el crecimiento de embriones de pinos sin el mega-gametofito. A partir de estos trabajos se obtuvieron resultados muy favorables en el crecimiento de embriones de Ginko (Li, 1934) y varias coníferas (La Rue 1935-1936) (Bidwell, 1979; López, 1985c; Orea y Villalobos, 1985; Pierik, 1990).

El cultivo de embriones ha permitido rescatar embriones en vid (Ramming y Emershad, 1984 citados por Manzo, 1991; Ramming, 1990), embriones de orquídeas (Rao, 1977), embriones de *Musa balbisiana* (Cox *et al.*, 1960 citados por Manzo, 1991), así como embriones híbridos de gramíneas (Hu y Wang, 1986) entre otros.

El cultivo de embriones ha permitido acortar los ciclos generacionales en los programas de mejoramiento (Nickell, 1951 citado por Manzo, 1991).

El cultivo de embriones está destacando actualmente (Hess, 1992), inclusive las investigaciones más recientes en pinos, se llevan a cabo con el uso de embriones como explante (Ver cuadro 4).

La naturaleza juvenil del embrión ofrece un alto potencial regenerativo que ofrece una especial expectativa para la propagación clonal de las coníferas (Hu y Wang, 1986; Margara, 1988; Pierik, 1990).

La razón para que esto ocurra es explicable, ya que con pocas excepciones el embrión que se encuentra en las semillas está totalmente desarrollado en una estructura bipolar, lo cual contiene un meristemo en cada polo y además los cotiledones. Por consiguiente, al momento de cultivar el embrión éste contiene células que potencialmente están preparadas para efectuar la división, alargamiento y diferenciación permitiendo el desarrollo progresivo de la raíz y los brotes axilares de la plántula (López, 1985c). Sin embargo se deben realizar estudios con este material para evitar la vitrificación que suele presentarse en los materiales tiernos y jóvenes (Pierik, 1990).

El tamaño relativamente grande de estos embriones, y la facilidad con que pueden aislarse han contribuido en gran parte a utilizarlos en aplicaciones prácticas tales como;

- A).- Eliminar la inhibición (absoluta) de germinación de las semillas de especies leñosas.
- B).- Germinación de semillas de parásitos obligados.
- C).- Acortar el ciclo de mejora. Existen muchas especies que presentan dormición seminal, la cuál frecuentemente se localiza en la cubierta de la semilla y/o en el endospermo.
- D).- Utilización en fitomejoramiento.
- E).- Estudios de los factores que rigen la morfogénesis in vitro. Estos conocimientos son útiles para mejorar los resultados cuando se use otro tipo de explante.
- F).- Germinación rápida de especies leñosas.
- G).- Aumentar la viabilidad en especies con problemas de viabilidad debido a diversas causas.
- H).- Propagación vegetativa.

(Flemion, 1948; Yeung et al., 1981 citados por Manzo, 1991; Vargas, 1982; López, 1985c; Pierik, 1990; Ramming, 1990).

La obtención de plántulas completas por esta técnica es un proceso que involucra varias fases secuenciales, proporcionando un promedio de 100 copias por explante, aunque este número puede oscilar a cantidades mayores o menores en cada especie (Durzan, 1980 citado por Vargas, 1982). En este sentido resalta el hecho comunicado por Thorpe (1981) citado por Vargas (1982), que obtuvo más de 200 brotes por semilla

con explantes de cotiledones de Pinus radiata en un periodo de 3 meses y arriba de 1,300, si el cultivo se mantiene por 6 meses.

En algunas ocasiones, en lugar de usar directamente el embrión completo para el cultivo in vitro, es posible utilizar sólo parte de él, sin que se alteren significativamente los resultados.

Es necesario tener presente que el valor genético de las plantas en los clones establecidos por el procedimiento del cultivo de embriones no puede asegurarse hasta que ellas se desarrollen, pues es difícil de especificar el potencial genético de las semillas en las cruza naturales (Durzan, 1980 citado por Vargas, 1982); debido a este hecho, el cultivo de embriones tiene grandes limitantes en los programas de mejoramiento genético donde el objetivo es propagar árboles "élite" y no su progenie (Vargas, 1982).

Una de las ventajas de los embriones para trabajar en condiciones in vitro es que están alojados en un ambiente aséptico, por lo que no es necesario una desinfección superficial. En la práctica, el embrión es removido del tejido que lo contiene (Torrey, 1973 citado por López, 1985c).

4.6.4.1.- Explante

Un explante es una parte de la planta (apice, órgano, fragmento de órgano o fragmento de tejido), separada y preparada para el cultivo aséptico in vitro, mediante esterilización superficial,

para ser colocada posteriormente en un medio nutritivo (Vargas, 1982; Margara, 1988; Pierik, 1990).

Los explantes más comúnmente utilizados en la Micropropagación son:

- Cultivo de tejidos somáticos o vegetativos,
- Meristemas secundarios,
- Meristemas primarios,
- Embriones maduros e inmaduros,
- Cultivo de tejidos gametofíticos,
- Cultivo de callos (Vargas, 1982).

La propagación masiva requiere que los explantes cultivados in vitro, proliferen de modo tal que existan muchas unidades capaces de regenerar plantas completas. El explante puede producir directamente brotes múltiples en su superficie o alternativamente puede haber una ocurrencia de células para formar una callosidad, la cuál tiene un potencial mayor de producción de brotes o embriones que el inóculo original.

Existen varios factores limitantes para una propagación vegetativa entre los cuales tenemos los siguientes:

- A).- **ESPECIE DE LA PLANTA.** En el caso de las Gimnospermas, de hecho, sólo se puede utilizar material juvenil para la regeneración. Las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa débil

(limitado potencial morfogénico), si se comparan con las especies herbáceas. La baja ocurrencia de embriogénesis somática en especies leñosas. La alta incidencia de órganos y plantas aberrantes en algunas especies. La excreción de sustancias tóxicas en los medios nutritivos. Las especies leñosas son muy propensas a este tipo de factor limitante.

B).- ESTADO DE MADURACION DEL EXPLANTE Y DEL DONADOR.
Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir.

C).- LA POSICION DEL EXPLANTE EN EL DONADOR.

D).- TIPOS DE EXPLANTE.

E).- CONDICION FISIOLOGICA, INCLUYENDO EL ESTADO NUTRICIONAL DEL EXPLANTE.

F).- EL PREACONDICIONAMIENTO DEL EXPLANTE.

G).- TIEMPO DE RECOLECCION DEL EXPLANTE.

(Alden, et al., 1977; Kramer et al., 1979; Rauter, R. M., 1982; 1983 citados por Van den D., 1991; David, 1982 citado por Pierik, 1990; Bhojwani y Razdan, 1983; Ochoa, 1985; Orea y Villalobos, 1985; Pierik, 1990).

Los tejidos jóvenes han mostrado mejores resultados in vitro que los adultos (Villalobos et al., 1983; Margara, 1988; Pierik, 1990; Gupta y Kreitinger, 1993).

Diversas investigaciones muestran que hasta ahora, es muy difícil lograr la diferenciación de órganos en tejidos del cambium en la

mayoría de las especies forestales, especialmente en las coníferas (Bonga, 1977 citado por Vargas, 1982). Inclusive Gupta y Kreitinger (1993) mencionan que no hay reportes de embriogénesis somática en tejidos maduros de árboles forestales. Sin embargo, los tejidos maduros tienen la ventaja sobre los tejidos jóvenes de que provienen de árboles que han mostrado su potencial genético. En general, mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores resultados se obtienen en el proceso de diferenciación de órganos (Villalobos et al., 1983; Margara, 1988; Pierik, 1990; Gupta y Kreitinger, 1993).

En la mayoría de las investigaciones en cultivo de tejidos realizados en el género Pinus, se han utilizado plántulas y embriones para su cultivo (Winton, 1978 citado por Barrientos, 1983).

Por regla general, son los tejidos provenientes del embrión los que expresan más frecuentemente, de una forma clara y reproducible la aptitud para la regeneración in vitro.

Los embriones responden muy bien, debido a que se trata de un material juvenil (Margara, 1988; Pierik, 1990).

El cultivo de embriones in vitro se emplea como un medio para acelerar el proceso de germinación en especies que en condiciones naturales presentan un periodo de germinación largo, así como también para aumentar el porcentaje de germinación de algunas especies, aunque también se ha utilizado para llevar a cabo estudios fisiológicos y morfogenéticos en diversas especies, sin embargo, el enfoque más importante dado al cultivo de embriones,

es su empleo sobre todo en la propagación de especies leñosas (Loo y Wang, 1943; Brown y Gifford, 1958; Berlyin y Miksche, 1965; Bonga, 1977; Winton, 1978; Sommer y Brown, 1979 citados por Vargas, 1982; Margara, 1988; Pierik, 1990; Becwar *et al.*, 1991; Chesick *et al.*, 1991).

Actualmente en el género Pinus es más común la utilización de embriones como explante (Ver cuadro 4).

CUADRO 4.- UTILIZACION DE EXPLANTES EN INVESTIGACIONES in vitro EN EL GENERO *Pinus*.

AUTOR (ES)	AÑO	ESPECIE	EXPLANTE	TEJIDO INDUCIDO/ ORGANOS
FLINN <i>etal.</i> (1)	1986	<i>Pinus strobus</i> L.	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
GUPTA Y DURZAN	1986	<i>Pinus lambertiana</i>	CALLO	EMBRIONES SOMATICOS
MUDGE, K.W. (1)	1986	<i>Pinus mugo</i>	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
PATEL <i>etal.</i> (1)	1986	<i>Pinus rigida</i>	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
BECWAR <i>etal.</i>	1987	<i>Pinus spp</i>	EMBRION	EMBRIONES SOMATICOS
BERLYN <i>etal.</i> (1)	1987	<i>Pinus caribaea</i> Morelet.	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
GLADFELTER Y PHILLIPS (1)	1987	<i>Pinus eldarica</i> Medw.	EMBRION	CALLO
GLADFELTER Y PHILLIPS	1987	<i>Pinus eldarica</i> Medw.	CALLO	VASTAGOS ADVENTICIOS
KAUL, K. (1)	1987	<i>Pinus strobus</i> L.	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
PEREZ-BERMUDEZ Y SOMMER (1)	1987	<i>Pinus elliotii</i> Engelm.	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
AMERSON <i>etal.</i>	1988	<i>Pinus taeda</i> L.	EMBRION	VASTAGOS ADVENTICIOS
BRONSON y DIXON	1988	<i>Pinus elliotii</i> Engelm.	COTILEDON	VASTAGOS ADVENTICIOS
FLINN <i>etal.</i> (1)	1988	<i>Pinus strobus</i> L.	EMBRION	YEMAS ADVENTICIAS
LAINE <i>etal.</i> (1)	1988	<i>Pinus oocarpa</i>	PROTOPLASTO	CALLO
LESNEY <i>etal.</i>	1988	<i>Pinus elliotii</i> Engelm.	PROTOPLASTO	CALLO
STIFF <i>etal.</i> (1)	1988	<i>Pinus strobus</i> L.	FASCICULOS	ELONGACION DEL EXPLANTE
THORPE, T.A.	1988	<i>Pinus radiata</i>	COTILEDON	YEMAS ADVENTICIAS
BAXTER <i>etal.</i> (1)	1989	<i>Pinus caribaea</i> Morelet.	EMBRION	YEMAS AXILARES
BAXTER <i>etal.</i> (1)	1989	<i>Pinus oocarpa</i>	EMBRION	YEMAS AXILARES
JAIN <i>etal.</i>	1989	<i>Pinus elliotii</i> Engelm.	EMBRION	EMBRIONES SOMATICOS
DIMATOGLOU <i>etal.</i>	1990	<i>Pinus pinea</i> L.	EMBRION	CALLO Y YEMAS ADVENTICIAS

CUADRO 4.- UTILIZACION DE EXPLANTES EN INVESTIGACIONES in vitro EN EL GENERO *Pinus*.

CONTINUACION...

AUTOR (ES)	AÑO	ESPECIE	EXPLANTO	TEJIDO INDUCIDO/ ORGAN0
LAINÉ Y DAVID	1990	<i>Pinus caribaea</i> Morelet.	EMBRIÓN Y FOTOPLASTO	EMBRIONES SOMÁTICOS
BECWAR <i>et al.</i>	1991	<i>Pinus taeda</i> L.	EMBRION	EMBRIONES SOMÁTICOS
CAROLE <i>et al.</i>	1991	<i>Pinus virginiana</i> Mill.	COTILEDON	VASTAGOS ADVENTICIOS
CHANG <i>et al.</i>	1991	<i>Pinus virginiana</i> Mill.	COTILEDON	VASTAGOS ADVENTICIOS
CHENG-XIOAFEI y LI WENDIAN	1991	<i>Pinus spp.</i>	VASTAGOS ADVENTICIOS	RIZOGENESIS
CHESICK <i>et al.</i>	1991	<i>Pinus strobus</i> L.	EMBRION	VASTAGOS ADVENTICIOS Y RIZOGENESIS
GATES Y GREENWOOD	1991	<i>Pinus resinosa</i>	EMBRION	EMBRIONES SOMÁTICOS
HIATT y ALLEN	1991	<i>Pinus palustris</i>	EMBRION	CALLO
HIATT y ALLEN	1991	<i>Pinus elliotii</i> Engelm.	EMBRION	CALLO
HIATT y ALLEN	1991	<i>Pinus taeda</i> L.	XILEMA SECUNDARIO	CALLO
HIATT y ALLEN	1991	<i>Pinus echinata</i>	XILEMA SECUNDARIO	CALLO
MARTINEZ <i>et al.</i>	1992	<i>Pinus canariensis</i>	COTILEDON	YEMAS ADVENTICIAS
MARTINEZ, P.C.	1992	<i>Pinus canariensis</i>	COTILEDON	EMBRIONES SOMÁTICOS
NEUMAN <i>et al.</i>	1992	<i>Pinus taeda</i> L.	COTILEDON	VASTAGOS ADVENTICIOS
GO <i>et al.</i>	1993	<i>Pinus caribaea</i> Morelet.	EMBRION	CALLO
HALOS Y GO	1993	<i>Pinus caribaea</i> Morelet.	EMBRION	VASTAGOS ADVENTICIOS
GUPTA y KREITINGER	1993	<i>Pinus lambertiana</i>	EMBRION	EMBRIONES SOMÁTICOS
JANA ZEL	1993	<i>Pinus taeda</i> L.	EMBRION	VASTAGOS ADVENTICIOS

FUENTE: (1) ELLIS Y WEBB (1993), TODOS LOS DEMAS AUTORES VER BIBLIOGRAFIA

4.6.4.2.- Medio de cultivo

El éxito del cultivo de tejidos de plantas, está muy influenciado por factores externos que afectan el proceso morfogénico, siendo los factores físicos y químicos los de mayor importancia (Street, 1979 citado por Deysi, 1987; López, 1985a).

Los factores físicos como la temperatura, potencial osmótico. pH del medio, son los que se relacionan directamente con las condiciones ambientales del cultivo de tejidos (Deysi, 1987; Pierik, 1990; Ellis y Webb, 1993).

Sin embargo, los factores químicos son determinantes en el desarrollo embrionario (Street, 1979 citado por Deysi, 1987; Jain *et al.*, 1989; Pierik, 1990; Litz, 1991).

El desarrollo embrionario está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados.

Es conocido que para un crecimiento adecuado de las plantas, necesitan tomar del suelo cantidades importantes de macronutrientes como las sales de Nitrógeno, Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio y Azufre; así como micronutrientes como sales de Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre, Molibdeno y Cobalto (López, 1985b).

Privados, en gran parte, de los mecanismos reguladores que se presentan en la planta entera, los explantes aislados cultivados *in vitro*, son especialmente sensibles a la acción de los iones minerales (Margara, 1988).

Thorpe (1978) estimó que presumiblemente la mayor parte del material que forma el medio de cultivo, entra al explante por concentración, difusión o por gradiente fisiológico.

Los nutrientes orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo son fundamentales, pues son los que van a proporcionar los elementos alimenticios que necesitan los explantes para iniciar su desarrollo y diferenciación. Los nutrientes, como elementos básicos de un medio de cultivo, se componen de una mezcla balanceada de macro y micronutrientes inorgánicos (Sales de cloruros, nitratos, sulfatos, fosfatos, además de iones de Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Potasio (K), Sodio (Na), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn) y Boro (B), y compuestos orgánicos (Vitaminas, aminoácidos y Carbohidratos) (Vargas, 1982; López, 1985b).

Frecuentemente la elección de una solución mineral adaptada a un problema dado se hace en forma empírica.

Los progresos constantes de la aplicación a la multiplicación vegetativa de los conocimientos del cultivo *in vitro*, no deben engañarnos, pues esto se traduce en la explotación de un número limitado de conocimientos, esencialmente empíricos, relativos a la importancia de la nutrición y la necesidad de investigar sistemáticamente el explante más apto para la propagación vegetativa *in vitro* (Margara, 1988).

En los primeros tiempos de la historia de los cultivos *in vitro*, no se efectuaron estudios particulares sobre el medio mineral. Actualmente se utilizan muchos medios minerales diferentes, para las coníferas (Margara, 1988; Dimatoglou *et al.*, 1990; Pierik, 1990; Cheng-Xioafei y Li Wendian, 1991).

Inclusive se sigue teniendo como problema esencial la composición del medio de cultivo. Los estudios independientes de cada elemento permitirían determinar la concentración óptima requerida de cada uno de los explantes utilizados de una especie en particular. Aunque es muy importante llevar a cabo estudios sistemáticos de este tipo, son poco numerosos los que se tienen actualmente.

Cualquiera que sea el método utilizado, los resultados solamente deben aplicarse al material vegetal considerado y en las condiciones experimentales en que se realice la experiencia. Su extrapolación a otros materiales o condiciones, resulta siempre aleatoria (Margara, 1988).

Para el cultivo de embriones maduros *in vitro*, se utiliza con mayor frecuencia el medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (MS) (1962), con modificaciones en la concentración de algún compuesto de acuerdo a la especie estudiada, esto es debido a que los embriones se desarrollan mejor en medios de cultivo ricos, que en otros más pobres (Evans *et al.*, 1981 citado por Vargas, 1982; Gupta y Durzan, 1986; Margara, 1988; Dimatoglou *et al.*, 1990; Pierik, 1990; Cheng-Xioafei y Li Wendian, 1991; Gates y Greenwood, 1991).

En términos generales, el medio de cultivo MS y otros medios, contienen los siguientes componentes:

4.6.4.2.1.- Sales inorgánicas

A).- MACRONUTRIENTES: Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de Hidrógeno, Oxígeno y Carbono, los elementos más usados principalmente son: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S) (López, 1985b).

El medio MS, está caracterizado, principalmente, por un contenido muy fuerte de Nitrógeno (60 meq/l aproximadamente) (Margara, 1988), este influye en el índice de crecimiento de la planta, es un elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas y en algunas hormonas del crecimiento (Narayanaswamy, 1977 citado por Vargas, 1982; Kyte, 1987).

El Nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma iónica NH_4^+ y NO_3^- (Bonga, 1974; Washer *et al.*, 1977 citados por Vargas, 1982; Raghavan, 1978 citado por López, 1985b; New Comb *et al.*, 1970; Tazawn *et al.*, 1978; Wetherell, 1978 citados por Lozoya, 1985; Kyte, 1987; Margara, 1988; Pierik, 1990).

Inclusive el Nitrógeno es uno de los componentes nutritivos de importancia para el desarrollo de embriones maduros, rizogénesis, crecimiento de callos y embriogénesis somática (Bonga, 1974; Washer *et al.*, 1977 citados por Vargas, 1982; Raghavan, 1978 citado por López, 1985b; Halperin, 1966; Reinert, 1973; Kohlenbach, 1978 citados por Deysi, 1987; López, 1985b; Pierik, 1990).

La mayor parte de las plantas prefieren el NO_3^- al NH_4^+ , aunque en algunos casos puede ocurrir lo contrario (Pierik, 1990). Esto se debe a que cuando se tiene una alta concentración de Nitrógeno, (especialmente en NH_4^+) puede favorecer la necrosis de tejidos a lo largo de trasplantes sucesivos (Margara, 1988).

De hecho, lo que ocurre en el medio de cultivo es lo siguiente: como se tiene Nitrógeno en las dos formas iónicas en el medio de cultivo, el explante absorbe primeramente los iones NH_4^+ , ocasionando que el pH disminuya, este pH más bajo, disminuye la absorción de iones NH_4^+ , absorbiéndose entonces los iones NO_3^- (Pierik, 1990).

Para algunos autores (Halperin, 1966; Kohlenbach, 1978 citados por Deysi, 1987; Jensen, 1976; Monnier, 1980 citados por Pierik, 1990; Pierik, 1990), consideran que el Nitrógeno en forma amoniacal es un factor importante en la embriogénesis somática y en el desarrollo de otros procesos biológicos del explante. En el medio de cultivo MS, el Nitrógeno amoniacal tiene una concentración de 20 mM (Gamborg et al., 1976).

Sin embargo otros autores (Reinert et al., 1966 citados por Margara, 1988; Gupta y Kreitinger, 1993), consideran que es mejor el Nitrógeno nítrico para la embriogénesis somática y otros procesos biológicos del explante en ausencia de Nitrógeno amoniacal. El contenido de Nitrógeno nítrico en el medio de cultivo MS es de 40 mM de concentración (Gamborg et al., 1976).

Estudios llevados a cabo por Wetherell y Dougall (1976) citados por Carbajal (1986); al utilizar Nitrato de Potasio (KNO_3) como única fuente de Nitrógeno (N), dio por resultado la baja formación de embrioides, esto es debido a que el Potasio (K) a altas concentraciones por lo general inhibe la embriogénesis somática (Bonga, 1974 citado por Vargas, 1982). Otros autores (Gupta y Kreitinger, 1993) han evaluado el uso de Nitrato de Calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0.1M como fuente de Nitrógeno (N) en el medio de cultivo MS, obteniendo buenos resultados en la embriogénesis somática de árboles forestales.

Todo lo anterior deja ver que es necesario encontrar la mejor proporción y fuente nitrogenada de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, para conseguir un crecimiento y desarrollo óptimos in vitro (Margara, 1988; Pierik, 1990).

B).- MICRONUTRIENTES: Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Cobalto (Co) y Molibdeno (Mo). Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (López, 1985b).

4.6.4.2.2.- Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas

cantidades. Las vitaminas más empleadas en el medio de cultivo son:

- TIAMINA (Vitamina B1): Se añade como Tiamina-HCL, en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. La Tiamina actúa junto con el Magnesio (Mg) como cofactor en la descarboxilación estimulando el proceso de respiración, de esa manera se evita la formación de Etanol, un inhibidor de la morfogénesis.

- ACIDO NICOTINICO (Niacina): Se añade en cantidades que pueden ir de 0.5 a 5.0 mg/l.

- PIRIDOXINA (Vitamina B6): Se añade como Piridoxina-HCL en cantidades que varían de 0.5 a 1.0 mg/l.

- MIO-INOSITOL: No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.

(Bonga, 1980 citado por Vargas, 1982; Raghavan, 1980 citado por Pierik, 1990; Gamborg *et al.*, 1976; López, 1985b; Margara, 1988; Pierik, 1990).

4.6.4.2.3.- Reguladores del crecimiento

Las hormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugares diferentes en donde son producidas y se

encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. También otros de tipo sintético, al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denominan reguladores del crecimiento (Pierik, 1990).

Los reguladores del crecimiento en el cultivo de embriones no han demostrado tener efecto significativo (Khan, 1975; Hu y Wang, 1978 citados por Manzo, 1991).

El papel exógeno de los reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico) durante el crecimiento de los embriones inducen modificaciones en el crecimiento (formación de callos) y morfogénesis de raíces (Monnier, 1976 citado por Pierik, 1990; López, 1985b).

Algunos autores han realizado investigaciones en embriones del género Pinus con reguladores del crecimiento teniendo éxito, pero recomiendan no usarlos en las primeras etapas del desarrollo, para después incluir algún regulador del crecimiento y así provocar la embriogénesis somática en los explantes (Dimatoglou et al., 1990; Pierik, 1990; Carole et al., 1991; Chang et al., 1991; Martínez et al., 1992; Neuman et al., 1992).

En general se requieren dos tipos de medio para la formación de embriones somáticos, uno para la iniciación de células embriogénicas y otro para el desarrollo subsecuente de los embrioides (Dodds y Lorin, 1982 citados por Deyssi, 1987).

4.6.4.2.4.- Carbohidratos

La fuente de carbohidratos más comúnmente empleada en el cultivo de embriones maduros e inmaduros, ha sido la sacarosa, azúcar

empleada universalmente. La concentración a la cuál se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/l (Narayanaswami y Norstog, 1964; Monnier, 1978; Yeung *et al.*, 1981; Bhojwani y Razdan, 1983; Hu y Wang, 1986 citados por Manzo, 1991; Pence *et al.*, 1981 citados por Carbajal, 1986; López, 1985b; Kyte, 1987; Pierik, 1990; Gates y Greenwood, 1991).

La sacarosa que se vende en los supermercados resulta generalmente adecuada. Se trata de un producto purificado, y de acuerdo con los análisis de los fabricantes se compone de 99.94 % de sacarosa, 0.02 % de Agua y 0.04 % de otras sustancias (elementos inorgánicos y también refinosa, fructuosa y glucosa). No existe ninguna indicación de que estos últimos constituyentes puedan causar toxicidad *in vitro*.

Después del autoclaveado la sacarosa se descompone produciendo fructuosa y glucosa (un medio autoclaveado que contuviese sacarosa inicialmente, pasa a tener una mezcla de diferentes azúcares) (Pierik, 1990).

La sacarosa es importante en el medio de cultivo ya que su efecto es no sólo como fuente de carbono bajo forma orgánica, sino también tiene el papel de rebajar el potencial osmótico del medio de cultivo (negativo) (Rijven, 1952 citado por Pierik, 1990; López, 1985b; Kyte, 1987; Margara, 1988; Ellis y Webb, 1993; Gupta y Kreitinger, 1993).

La aportación de carbono orgánico es importante para cualquier explante, ya que estos tienen una débil actividad clorofílica, por lo que se considera que los explantes no son autótrofos y por

lo tanto no son capaces de fijar carbono de la atmosfera como comúnmente se lleva a cabo en la fotosíntesis (López, 1985b; Kyte, 1987; Margara, 1988).

La demanda de sacarosa varía con el estado de desarrollo del embrión, así los embriones muy jóvenes requieren concentraciones de sacarosa relativamente altas, mientras que para embriones maduros se cultivan generalmente sobre un medio con sacarosa al 2-3 % (Rijven, 1952; Monnier, 1980 citados por Pierik, 1990; Kyte, 1987; Pierik, 1990).

Se ha determinado que el crecimiento y la supervivencia del cultivo de embriones es incrementada marcadamente por la suplementación de una fuente de carbono al medio de cultivo (Bhojwani y Razdan, 1983; López, 1985b; Gupta y Kreitinger, 1993).

Un estudio realizado por Gates y Greenwood (1991) demostró que una concentración elevada de sacarosa (21 %) en embriones de *Pinus resinosa*, promovía incrementos importantes en volumen y peso seco del embrión.

También se ha determinado que la sacarosa promueve la rizogénesis y embriogénesis somática en explantes de especies leñosas (Rietsema *et al.*, 1953; Honma, 1955 citados por López, 1985b; Pierik, 1990; Gupta y Kreitinger, 1993).

4.6.4.2.5.- Agua

El agua es uno de los componentes más importantes ya que constituye el 95 % del medio de cultivo.

Sin embargo, el agua, aunque sea relativamente pura, puede contribuir con más impurezas al medio de cultivo que el material de cristalería, instrumentos, agar o reactivos químicos. El agua corriente contiene minerales, aceites, óxidos metálicos, productos corrosivos, microorganismos, material orgánico y sales disueltas. Para liberar el agua de tales impurezas, el método más comúnmente usado es la destilación (López, 1985a,b; Pierik, 1990).

De hecho, el agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada (López, 1985b)

El almacenamiento del agua debe ser por corto tiempo, ya que de lo contrario puede disolver sustancias químicas de los recipientes (trazas de plomo, sodio y arsénico en vidrio que no sea tipo Pyrex) y si se encuentra en contacto con la atmósfera puede acumular polvo, microorganismos o sustancias volátiles. Algunas bacterias crecen rápidamente en agua destilada (López, 1985a,b; Pierik, 1990).

4.6.4.2.6.- Agentes gelificantes

El estado físico del medio de cultivo es otra característica que afecta el desarrollo embrionario *in vitro*, principalmente relacionada a los requerimientos nutrimentales (Vasil y Vasil, 1972 citados por Carbajal, 1986).

La mayoría de las veces es necesario emplear medios que tengan sustrato sólido, semisólido e inclusive líquidos, que ayuden a el desarrollo del embrión (Winton y Huhtinen, 1976 citados por Vargas, 1982).

En el uso de medios de cultivo sólidos, se emplea el agar o gelosa que permite gelificar el medio y formar un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. Se usa a una concentración de 0.5 al 1.5 %, produciéndose inhibiciones en el crecimiento si se utilizan concentraciones más altas (Hu y Wang, 1986 citados por Manzo, 1991; Vargas, 1982; López, 1985b; Pierik, 1990).

El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios de cultivo.

El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener agua (cuanto mayor es la concentración de agar, mayor es la fuerza con la que el agua es retenida) y adsorber compuestos (Pierik, 1990).

Las ventajas que presenta el agar son:

- A).- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- B).- El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- C).- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- D).- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio (López, 1985b).

Sin embargo, Margara (1988) considera que no todo es ventaja en el agar, ya que presenta inconvenientes. El principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que, como consecuencia inhibe el crecimiento de algunos tejidos. La composición del agar es,

por otra parte, variable y mal definida. Además es posible que el agar pueda aportar elementos orgánicos y minerales, particularmente oligoelementos, que actúan favorablemente sobre el crecimiento.

El pH juega un papel importante en medios sólidos, semisólidos o líquidos, sin embargo en medios sólidos el pH tiene un efecto sobre la consistencia, ya que a 4.8 de pH, los medios sólidos son blandos y a pH de 6.0 son de consistencia dura (López, 1985b; Pierik, 1990).

Otro efecto del pH es sobre el explante utilizado, ya que un pH menor de 4.5 o mayor de 7.0, generalmente frenan el crecimiento y desarrollo in vitro (Pierik, 1990), de ahí que se aconseje ajustar el pH a 5.7± 0.1 (Cheng, 1975; Coleman y Thorpe, 1977 citados por Vargas, 1982; Kyte, 1987; Margara, 1988; Pierik, 1990).

Para algunos autores (Shabde-Moses y Murashige, 1979; Hu y Wang, 1986 citados por Manzo, 1991; Margara, 1988), el uso de medios sólidos en el cultivo de embriones, son mejores que los medios líquidos.

Mientras otros autores consideran lo contrario (Hall, 1948; Rabechault et al., 1972 citados por Pierik, 1990; Thorpe, 1982 citado por Deysi, 1987; Hammers-Chalg, 1982 citado por Villegas, 1985; Pierik, 1990).

En los últimos años el uso de los medios llamados de 2-fases, se ha hecho bastante habitual, se trata de una fase sólida y otra

liquida, en las cuales se combinan una alta tasa de multiplicación con una más baja sensibilidad a la vitrificación (Pierik, 1990).

Una de las razones por las que se utilizan los medios líquidos, es que la formación de raíces adventicias y la embriogénesis en especies forestales suele ser menor en medios sólidos (Thorpe, 1982 citado por Deysi, 1987; Pierik, 1990). Sobre medios sólidos las raíces pueden incluso presentar un geotropismo negativo (Pierik, 1990).

El uso de sustrato o soporte en los medios líquidos es necesario, de ahí que Hartman y Kester (1978) mencionan que el papel filtro como sustrato puede ser más adecuado cuando se pretende inducir la formación de raíz, ya que de esta manera se producen más raíces con pelos radicales que cuando se emplea agar.

Haissig (1965) citado por Vargas (1982), relaciona este hecho con la disponibilidad de oxígeno en el medio.

Mientras que Cheng y Voqui (1977); Cheng (1979) citados por Vargas (1982) y Pierik (1990), recomiendan utilizar un soporte artificial de poliéster sobre medio líquido, que sirve como puente entre éste y el explante; esta técnica proporciona ciertas ventajas sobre los sustratos convencionales ya que permite con libertad el flujo de nutrientes del medio y facilita así la alimentación requerida en cada etapa de desarrollo, sin necesidad de transferir el cultivo.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Aspectos generales

5.1.1.- Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de la Carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

5.1.2.- Material vegetal empleado

Se utilizaron semillas de *Pinus cembroides* Zucc., donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (I.N.I.F.A.P.) ubicado en Coyoacán México, D.F., provenientes de colectas realizadas en el Estado de Guanajuato.

5.1.3.- Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en la presente investigación, consistió en un diseño de parcelas divididas completamente al azar con arreglo factorial (Ver cuadro 5). En total se evaluaron 16 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, y la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo; dando un total de 160 unidades experimentales.

Para la comparación de medias, se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%

5.1.4.- Fecha de siembra

La presente investigación se estableció el 31 de Mayo de 1993 y se terminó de evaluar el 15 de Julio de 1993

CUADRO 5.- DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN LA PRESENTE INVESTIGACION.

MEDIOS LIQUIDOS		MEDIOS SOLIDOS	
#1	2	1	2
**2	5	16	11
3	4	3	4
4	8	13	9
5	6	5	6
1	7	14	15
7	8	7	8
3	6	10	12

* UNIDAD EXPERIMENTAL

** TRATAMIENTO

TRATAMIENTOS MEDIOS LIQUIDOS

- 1 TESTIGO de NH_4NO_3
 2 5mM de NH_4NO_3
 3 10mM de NH_4NO_3
 4 20mM de NH_4NO_3
- 5 TESTIGO de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 6 5mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 7 10mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 8 20mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

TRATAMIENTOS MEDIOS SOLIDOS

- 9 TESTIGO de NH_4NO_3
 10 5mM de NH_4NO_3
 11 10mM de NH_4NO_3
 12 20mM de NH_4NO_3
- 13 TESTIGO de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 14 5mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 15 10mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
 16 20mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

5.1.5.- Variables a evaluar

Las variables a evaluar son las siguientes:

a).-Porcentaje de contaminación (%). Los datos para obtener el porcentaje de contaminación en los dos medios de cultivo (sólidos y líquidos), se tomarán cada tres días, registrandose en una tabla; al finalizar la evaluación se determinarán los porcentajes para cada medio de cultivo.

b).-Porcentaje de sobrevivencia (%). Los porcentajes se obtuvieron en forma visual para cada tratamiento, tomando en consideración los embriones que tenían un desarrollo adecuado, llevandose a cabo al termino de la evaluación.

c).- Desarrollo embrionario en peso (g). Para la determinación de esta variable se empleo la balanza analitica con que se cuenta en el Laboratorio, determinandose el peso inicial y el peso final.

d).-Desarrollo embrionario en longitud (cm). Para la determinación de está variable se empleo una regla milimetrica, con la cual se determino el desarrollo en longitud de los embriones al termino de la evaluación.

5.2.- Preparación del medio de cultivo

5.2.1.- Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para la presente investigación fué el de Murashige y Skoog (MS) (1962) (Ver cuadro 7), al 50% de su concentración original. Se realizaron dos medios de cultivo, medios sólidos con la adición de agar y medios líquidos con un soporte artificial de pollester.

CUADRO 6.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962).

SALES INORGANICAS			
MACROELEMENTOS (mg/l)		MICROELEMENTOS (mg/l)	
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KI	0.83
K ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Na ₂ -EDTA	74.50	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
COMPUESTOS ORGANICOS			
AC. NICOTINICO	0.5 mg/l	MIQ-INOSITOL	100 mg/l
GLICINA	2.0 mg/l	TIAMINA	0.1 mg/l
PIRIDOXINA	0.5 mg/l	SACAROSA	30.0 g/l
		AGAR	6.0 g/l

5.2.2.- Fuentes nitrógenadas

El medio de cultivo MS contiene dos fuentes principales que proveen del nitrógeno a los explantes, siendo el Nitrato de Amonio (NH₄NO₃) y Nitrato de Potasio (KNO₃), sin embargo, para la presente investigación se elimino el Nitrato de Potasio, debido a que de acuerdo con los estudios realizados por Wetherell y Dougall (1976) citados por Carbajal (1986), así como los realizados por Bonga (1974) citado por Vargas (1982), demuestran el efecto negativo que tiene el Potasio (K) en la embriogénesis, así como en la formación de embrioides; por lo cual sólo se evaluarón el Nitrato de Amonio y se incluyó el Nitrato de Calcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O), los cuales se evaluarón independientemente a cuatro niveles de concentración milimolar.

5.3.- Desinfección y siembra de los embriones

La metodología empleada en la presente investigación es propuesta de comunicación personal por el Ing. Agr. Francisco Cruz Pizarro, en 1993, consistiendo en el siguiente proceso:

a).- Desinfección de la semilla. Las semillas de *Pinus cembroides* Zucc., fueron lavadas con agua corriente y un detergente comercial. Después se procedió a la escarificación mecánica de las semillas.

b).- Desinfección de la semilla sin tegumentos. Después de la escarificación mecánica, se procedió a colocar las semillas escarificadas en una solución con alcohol al 10% más un detergente biológico (Tween 20), durante 5 minutos, para luego colocarse en una solución de hipoclorito de sodio al 10% más detergente biológico (Tween 20), durante 5 minutos. Todo lo anterior se realizó con la ayuda del agitador magnético con que cuenta el Laboratorio.

Una vez desinfectadas las semillas y con ayuda de la campana de flujo laminar, se enjuagaron 3 veces con agua destilada-esterilizada.

c).- Inoculación. Una vez que se tuvieron las semillas desinfectadas, se procedió a remover el endospermo con la ayuda del bisturí y las pinzas, estos materiales deben estar lavados y esterilizados previamente, así como flameados para aumentar el porcentaje de asepsia, una vez que se ha retirado el endospermo, se procede a la inoculación del embrión en el tubo de ensaye, y cada vez que se realice el proceso anterior, se deberán limpiar y flamear tanto el material de cristalería como el bisturí y las pinzas.

5.4.- Condiciones de incubación

Una vez terminada la inoculación, se identificarón los tubos de ensaye, colocandolos en una cámara de cultivo con ambiente controlado. Las condiciones de incubación fuerón las siguientes: Temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz proporcionado por lámparas fluorescentes a una intensidad luminica de aproximadamente 3,000 luxes.

6.- ANALISIS DE RESULTADOS

6.1.- Porcentaje de contaminación

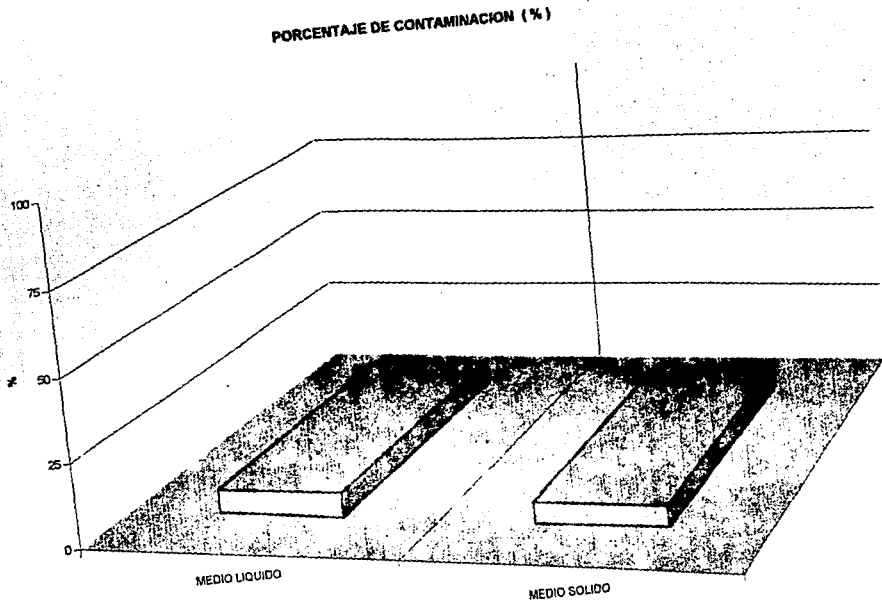
Uno de los factores que más limita a la Micropropagación, es la contaminación, ya que nos afecta el crecimiento y desarrollo del explante (Campbell, 1985 citado por Debergh *et al.*, 1991).

La contaminación también surte efecto en la elevación de nuestros costos por cada planta obtenida (Wright, 1986; Long *et al.*, 1988; Leifert *et al.*, 1989a citados por Debergh *et al.*, 1991), esto da como resultado que inclusive en algunas especies forestales, resulte más barato producirlas por semilla que producirlas en condiciones *in vitro* (Faulkner, 1975 citado por Niembro, 1986). De aquí se desprende la necesidad de obtener un método eficiente de esterilización para la especie *Pinus cembroides* Zucc., el cuál nos permita bajar los costos por planta obtenida en un futuro.

El método utilizado en la presente investigación nos arroja resultados que están por debajo del límite comercial (menos del 10%) (Wright, 1986; Long *et al.*, 1988; Leifert *et al.*, 1989a citados por Debergh *et al.*, 1991); ya que en los medios líquidos, la contaminación fué de un 7.14% y en los medios sólidos de un 6.42% (ver figura 6); ocasionada por hongos principalmente, y por bacterias en una incidencia menor. Por lo anterior consideró que la contaminación obtenida es aceptable y nuestros resultados son buenos.

Sin embargo, estos resultados pueden mejorarse, ya que debemos recordar que los embriones como explante inicial se encuentran

Figura 6.- Porcentaje de contaminación en los tratamientos



alojados en un ambiente aséptico (Torrey, 1973 citado por López, 1985c). Lo anterior, nos da pauta a que debemos evaluar el método de esterilización, probando otras concentraciones de Hipoclorito de sodio, así como de alcohol e inclusive manejar también otros tiempos de esterilización, y porque no, esterilizar la semilla antes de iniciar el proceso de escarificación.

6.2.- Porcentaje de sobrevivencia

En la mayor parte de las investigaciones en Micropropagación en el género *Pinus*, se utilizan embriones como explantes (Winton, 1978 citado por Barrientos, 1983; Margara, 1988; Pierik, 1990; Ellis y Webb, 1993; Gupta y Kreitinger, 1993), debido a que expresan de una forma clara y reproducible su aptitud para la regeneración *in vitro*.

Sin embargo, existen factores que limitan el crecimiento y desarrollo de los embriones, los cuales afectan nuestro porcentaje final de sobrevivencia (Margara, 1988; Pierik, 1990; Litz, 1991). Dentro de estos factores tenemos la composición del medio de cultivo (Lozoya, 1985; Carbajal, 1986); empezando por las necesidades nutricionales, de las que destaca el Nitrógeno, el cual sigue habiendo polémica de la forma de como debe ser suministrado (Lozoya, 1985; Carbajal, 1986; Margara, 1988; Pierik, 1990). Mientras unos autores (Halperin, 1966; Kohlenbach, 1978 citados por Deyssi, 1987; Jensen, 1976; Nonnier, 1980 citados por Pierik, 1990; Gamborg et al., 1976; Pierik, 1990) consideran que el Nitrógeno en forma de Amonio es mejor que el Nitrógeno en forma de Nitrato, otros autores (Reinert et al., 1966 citados por Margara, 1988; Gupta y Kreitinger, 1993) consideran lo contrario.

En lo que respecta a la presente investigación, podemos observar que la mayor sobrevivencia en los embriones, se dio con el tratamiento 14 (ver figura 7), en el cual, la forma en que se suministro el Nitrógeno fué como Nitrato de Calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ arrojandonos un 60% de sobrevivencia. Aunque debemos estar conscientes que los resultados obtenidos están influenciados por otro factor: la vitrificación. Uno de los problemas graves que se presenta en el crecimiento y desarrollo de los embriones en condiciones in vitro es la vitrificación, debido a que por regla general, los tejidos jóvenes y tiernos suelen presentar índices de vitrificación (Pierik, 1990).

En la figura 8 podemos observar como se presentó la vitrificación en ambos medios (líquidos y sólidos), sin embargo, fueron los medios líquidos los que presentaron una mayor disposición a la vitrificación; ya que de acuerdo con Pierik (1990) y Litz (1991), esta condición fisiológica se presenta especialmente en los explantes que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar. Inclusive se puede observar el comportamiento relativo a la vitrificación que presentaron los tratamientos sólidos en los que se utilizó el Nitrógeno en forma de ion Amonio; que de acuerdo con Pierik, (1990) es el que se absorbe primeramente, ocasionando una disminución de pH en los medios de cultivo sólidos; los cuales al tener un pH menor tienden a tener una consistencia semisólida (López, 1985b, Kyte, 1987; Margara, 1988; Pierik, 1990), esto da como resultado que el explante cuente con una disposición extra de agua en los medios sólidos y por lo tanto sea más fácil que se de la vitrificación.

Figura 7.- Porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos estudiados.

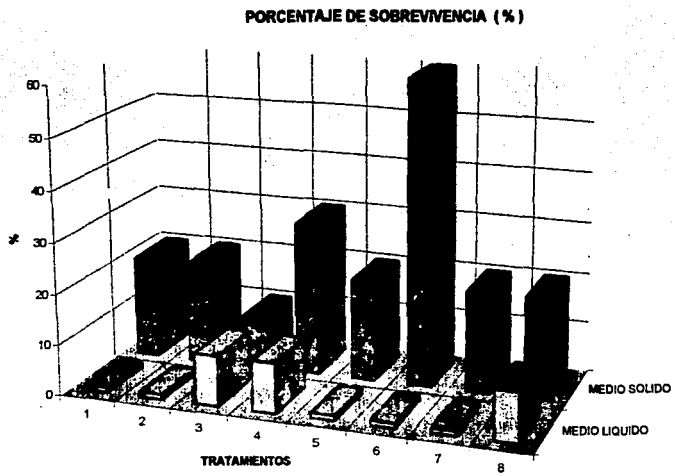
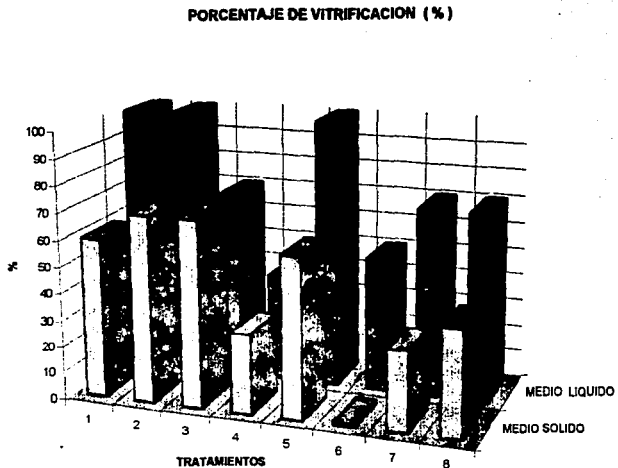


Figura 8.- Porcentaje de vitrificación en los tratamientos estudiados.



6.3.- Desarrollo embrionario en peso

El análisis de varianza, para esta variable (ver cuadro 7); nos da como resultado en la fuente de variación: tratamientos, una diferencia altamente significativa, mientras que para la fuente de variación estado físico del medio de cultivo, es no significativa; sin embargo para las fuentes de variación niveles y fuentes Nitrógenadas son altamente significativas, lo cual nos ayuda a corroborar la importancia que tiene el Nitrógeno en el incremento de peso en los embriones.

De los tratamientos totales (ver figura 9), los que obtuvieron mayor incremento en peso, son los tratamientos 4 (líquido) y 12 (sólido), los cuales presentan el Nitrógeno en su forma de Amonio, teniendo el más alto nivel de la presente evaluación: 20mM.

Esto afirma que al menos para la variable desarrollo embrionario en peso, es mejor el Nitrógeno en forma de Amonio. Esto se puede observar claramente en la figura 9, el ion Amonio es el que se absorbe primeramente en el embrión (Pierik, 1990); de ahí que los tratamientos que contenían el Nitrógeno en forma de ion Amonio son los que registran un mayor incremento en peso.

En lo que respecta a las interacciones estado físico del medio/niveles, así como la interacción estado físico del medio/fuentes Nitrógenadas, la diferencia que nos arroja el análisis de varianza es no significativa, lo cual nos deja ver que el estado físico del medio de cultivo no interfiere, al menos, para el desarrollo embrionario en peso. Esto se reafirma por lo anteriormente dicho.

CUADRO 7.- ANALISIS DE VARIANZA DEL
DESARROLLO EMBRIONARIO EN PESO.

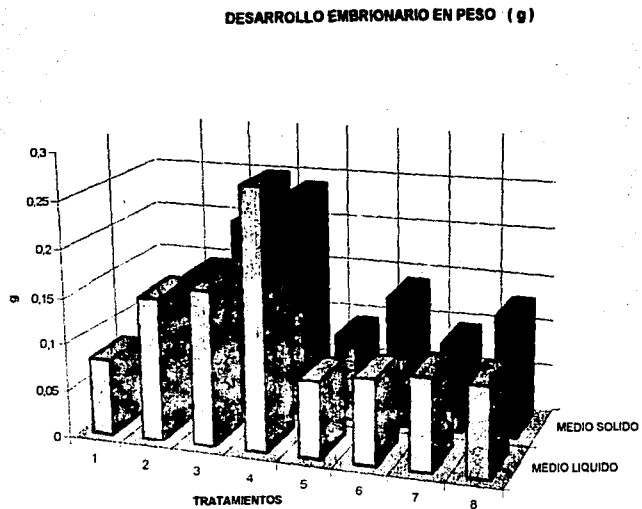
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRATAMIENTOS	15	0.5317	0.0354	6.6792	1.75**
A (EDO. FISICO)	1	0.0066	0.0066	1.2452	3.92NS
B (NIVELES)	3	0.1922	0.0641	12.094	2.68**
C (FUENTES)	1	0.1812	0.1812	34.188	3.92**
AB	3	0.0025	0.0008	0.1509	2.68NS
AC	1	0.0046	0.0046	0.8679	3.92NS
BC	3	0.1223	0.0408	7.6981	2.68**
ABC	3	0.1517	0.0506	9.5471	2.68**
ERROR	129	0.6817	0.0053		
TOTAL	159	1.8745			

CV = 53.72%

CUADRO 8.- COMPARACION DE MEDIAS DEL DESARROLLO
EMBRIONARIO EN PESO MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.

T 4.- 0.2738	a	T 7.- 0.0966	b
T12.- 0.2378	a	T 8.- 0.0939	b
T11.- 0.2076	b	T15.- 0.0931	b
T 3.- 0.1656	b	T 9.- 0.0915	b
T 2.- 0.1526	b	T13.- 0.0915	b
T10.- 0.1431	b	T 6.- 0.0893	c
T14.- 0.1401	b	T 1.- 0.0809	c
T16.- 0.1292	b	T 5.- 0.0809	c

Figura 9.- Desarrollo embrionario en peso de los tratamientos estudiados.



Sin embargo, la interacción niveles/fuentes nitrogenadas presentan una diferencia altamente significativa; esto nos explica porque la interacción estado fisico/niveles/fuentes nitrógenadas nos da como resultado una diferencia altamente significativa.

La comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 5%, nos da como resultado que los tratamientos del grupo a: 4 y 12 son estadísticamente iguales entre si pero diferentes a los tratamientos del grupo b: 11, 3, 2, 10, 14, 16, 7, 8, 15, 9 y 13, estos a su vez son estadísticamente iguales entre si pero diferentes a los tratamientos del grupo c: 6, 1 y 5; de los cuales los tratamientos del grupo a son estadísticamente superiores a los del grupo b y c. (Ver cuadro 8).

6.4.- Desarrollo embrionario en longitud

El análisis de varianza para esta variable (ver cuadro 9), nos da como resultado en las fuentes de variación: tratamientos y estado fisico del medio de cultivo, una diferencia altamente significativa respectivamente, mientras que para las fuentes de variación niveles y fuentes Nitrógenadas, la diferencia es no significativa. Esto nos ayuda a visualizar la importancia que tiene el estado fisico del medio de cultivo para lograr incrementos de longitud en los embriones (Ver figura 10); dandonos como resultado que los medios sólidos son mejores para la obtención de incrementos importantes en longitud, más no así la forma en que se presenta el Nitrógeno.

El tratamiento con el cual se obtuvieron los mayores incrementos de longitud, fué en el tratamiento 14 (5mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

En lo que respecta a las interacciones estado fisico del medio/niveles, así como a la interacción estado fisico del medio/fuentes Nitrógenadas, la diferencia que nos arroja el análisis de varianza es significativo, lo cual nos deja ver que el estado fisico del medio de cultivo si interfiere, al menos para el desarrollo embrionario en longitud.

Esto se reafirma con lo anteriormente dicho.

Sin embargo, la interacción niveles/fuentes Nitrógenadas presenta una diferencia no significativa, esto nos explica el porque la interacción estado fisico del medio/niveles/fuentes Nitrógenadas nos da como resultado una diferencia no significativa.

La comparación de medias con Tukey con un nivel de significancia del 5%, nos da como resultado que los tratamientos del grupo a: 14 y 16, son estadísticamente iguales entre sí, pero diferentes a los tratamientos del grupo b: 10,12,13,9,15,11,4,3,8,2,1,5,7 y 6; siendo superiores los tratamientos del grupo a (Ver cuadro 10).

CUADRO 9.- ANALISIS DE VARIANZA DEL
DESARROLLO EMBRIONARIO EN LONGITUD.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRATAMIENTOS	15	84.214	5.614	2.602	1.75**
A (EDO. FISICO)	1	46.225	46.225	21.430	3.92**
B (NIVELES)	3	7.314	2.438	1.438	2.68NS
C (FUENTES)	1	0.324	0.324	0.150	3.92NS
AB	3	13.153	4.384	2.032	2.68*
AC	1	7.056	7.056	3.271	3.92*
BC	3	3.084	1.028	0.476	2.68NS
ABC	3	7.058	2.353	1.091	2.68NS
ERROR	129	278.31	2.157		
TOTAL	159	446.74			

CV = 94.14%

CUADRO 10.- COMPARACION DE MEDIAS DEL DESARROLLO
EMBRIONARIO EN LONGITUD MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.

T14.- 3.71	a	T 4.- 1.47	b
T16.- 2.21	a	T 3.- 1.26	b
T10.- 2.03	b	T 8.- 1.14	b
T12.- 1.96	b	T 2.- 1.09	b
T13.- 1.76	b	T 1.- 0.93	b
T 9.- 1.76	b	T 5.- 0.93	b
T15.- 1.73	b	T 7.- 0.83	b
T11.- 1.62	b	T 6.- 0.53	b

DESARROLLO EMBRIONARIO EN LONGITUD (cm)

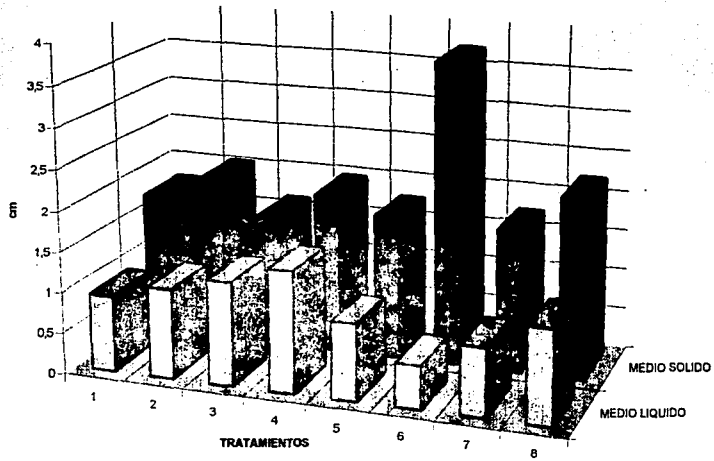


Figura 10.- Desarrollo embrionario en longitud de los tratamientos estudiados.

7.- CONCLUSIONES

- * El método de esterilización utilizado en la presente investigación es efectivo, debido a los porcentajes de contaminación que se presentaron en cada medio de cultivo.
- * El mejor tratamiento para obtener el mayor porcentaje de sobrevivencia, así como el mayor incremento en longitud en los embriones de Pinus cembroides Zucc., es el tratamiento 14 (5mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).
- * Los mejores tratamientos para obtener el mayor incremento en peso, son los tratamientos 4 (líquido) y 12 (sólido) con 20mM de NH_4NO_3 .
- * El Nitrógeno en forma de Amonio es el más adecuado para lograr incrementos en peso para los embriones de Pinus cembroides Zucc.
- * El estado físico del medio de cultivo sí afecta el desarrollo embrionario en longitud de Pinus cembroides Zucc.
- * Los medios sólidos son mejores que los medios líquidos en lo que respecta al porcentaje de sobrevivencia, así como a el incremento en longitud de los embriones de Pinus cembroides Zucc.
- * La emisión de raíces se observó en todos los tratamientos, sin embargo los medios líquidos presentaron más desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

- * Amerson, H. V.; Frampton, L. J., Jr.; Mott, R. L.; Spaine, P.C. (1988) TISSUE CULTURE OF CONIFERS USING LOBLOLLY PINE AS A MODEL. Genetic manipulation of woody plants [Edited by Hanover, J. W.; Keathley, D. E.] 1988 Basic Life Sciences, Vol. 44, pag.117-137 New York, U. S. A.; Plenum press.
- * Avila N., J. A. (1985) CARACTERIZACION DE LOS PINONEROS (Pinus cembriodes Zucc. y Pinus discolor Bailey y Hawks) de las serranias meridionales del Estado de San Luis Potosi, México. Tesis Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich. 101 pag.
- * Bailey, D. K. y Hawksworth, F. G. (1979) PINYONS OF CHIHUAHUAN DESERT REGION. Phytologia 44(3) : 129-133 p
- * Barrientos P, L. (1983) ESTUDIO MORFOGENETICO IN VITRO DE INOCULOS PROVENIENTES DE Pinus cembroides Zucc., P. patula SchL. et Cham y P. pseudostrobus LindL. Tesis. U.A.Ch. Chapingo, México. 51 p
- * Becwar, M. R.; Blush, T. D.; Brown, D. W.; Chesick, E. E. (1991) MULTIPLE PATERNAL GENOTYPES IN EMBRYOGENIC TISSUE DERIVED FROM INDIVIDUAL IMMATURE LOBLOLLY PINE SEEDS. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Netherlands) (1991) V 26 (1):37-44.

- * Becwar, M. R.; Wann, S. R.; Johnson, M. A.; Verhagen, S. A.; Feirer, R. P.; Nagmani, R. (1987) DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF IN VITRO EMBRYOGENIC SYSTEMS IN CONIFERS. In: Ahuja, M. R. (ed.) SOMATIC CELL GENETICS OF WOODY PLANTS: PROCEEDINGS OF THE IUFRO WORKING PARTY S2. 04-07 Somatic Cell Genetics, held in Grosshansdorf, Federal Republic of Germany 10-13 August 1987. Boston (U. S. A.) Kluwer Academic 1988 p 1-18.
- * Benavides M, H. M. (1987) CONDUCTANCIA Y RESISTENCIA ESTOMATICA EN 2 ESPECIES DE PINONEROS (Pinus cembroides Zucc. y Pinus discolor Bailey y Hawks). Tesis. Colegio de Postgraduados. México. p. 1-14
- * Besnier R, F. (1989) SEMILLAS (BIOLOGIA Y TECNOLOGIA) Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España p 21-44 y p 121-145.
- * Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. (1983) PLANT TISSUE CULTURE: THEORY AND PRACTICE. Developments in crop science (5) Elsevier 502 p
- * Bidwell, R. G. S. (1979) FISILOGIA VEGETAL. Traducción al español de Cano y Cano, G. G. y Rojas, G. M. A. G. T. Editor. 784 p
- * Botkin, C. W. and Shires, L. B. (1948) THE COMPOSITION AND VALVE OF PINON NUTS. New Mexico Agricultural and Experiment. Station Bulletin. 344:3-14

- * Bronson, M. R.; Dixon, R. K. (1988) IN VITRO PLANTLET FORMATION FROM EMBRYONIC COTYLEDONS OF Pinus elliottii Engelm. Proceedings, 10th North American Forest Biology Workshop, "Physiology and genetics of reforestation", Vancouver, British Columbia. July 10-22, 1988 [Compiled and edited by Worrall, J.; Loo Dinkins, J.; Lester, D. P.] 1988 p 261-267. Vancouver, Canada; University of British Columbia.
- * Carbajal H, C. (1986) OBTENCION IN VITRO DE EMBRIONES SOMATICOS A PARTIR DE OVULOS FECUNDADOS DE Carica papaya L. Y SU ONTOGENIA. Tesis. F.E.S.-C., Cuautitlán. México. p 16-64
- * Carole, H. S.; Frank, A. B. y Henry V. A. (1991) IN VITRO PROPAGATION OF VIRGINIA PINE FROM COTYLEDONS. Journal American Society Horticulture Science (1991) 116 (2): 326-365
- * Cetina, A. V. M.; García, M. E. y Keyes, M. R. (1985) ANALISIS ESTRUCTURAL DE UN BOSQUE DE Pinus cembroides Zucc. EN LA AMAPOLA S. L. P.. En: J. E. Flores L. (ed.) Memorias del Primer Simposium Nacional sobre Pinos Pifoneros. Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables, U.A.N.L., Linares, N.L. México. p 100-109
- * Cetina A., V. M. (1984) Estudio sobre germinación del Pinus cembroides Zucc. EN CONDICIONES NATURALES. Tesis Colegio de Postgraduados, México. p 7-16

- * Chang, S.; Sen, S.; McKinley, C. R.; Aimershalliday, J.; Newton, R. J. (1991) CLONAL PROPAGATION OF VIRGINIA PINE (Pinus virginiana Mill) BY ORGANOGENESIS. Plant Cell Reports (1991) V10(3):131-134
- * Cheng-Xiaoafei; Li Wendian (1991) TISSUE CULTURE OF TAIWANIA FLOUSIANA GAUSSSEN. Forest Research (China) Apr. 1991 V4(2):147-152
- * Chesick, E. E.; Mohn, C. A.; Hackett, W. P. (1991) PLANTLET MULTIPLICATION FROM WHITE PINE (Pinus strobus L.) EMBRYOS IN VITRO: BUD INDUCTION AND ROOTING. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Netherlands) Aug. 1991 V26(2):107-114
- * Cornu, D. (1990) APPORT DES TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO DANS LES PROGRAMMES D'AMELIORATION DE CERTAINES ESPECES FORESTIERES. Colloques-de L'INRA. 1990 No.51, Culture of plants 10th colloquium of the French section of the International Association for Plant Tissue Culture, Versailles, France, 24-25 October, 1989.
- * Cuanalo G, P. (1979) EL PINO PINONERO Pinus cembroides spp. (sic) EN LOS BOSQUES DE MEXICO. Durango, México. 76 p
- * Daniel, P. W.; Helms, U. E. y Baker, F. S. (1982) PRINCIPIOS DE SILVICULTURA. Ed. Mc Graw-Hill. México. 492 p
- * Debergh P.C. y Zimmerman R.H. (1991) MICROPROPAGATION. Ed. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. 484 p.
- * Deysi M, C. (1987) EMBRIOGENESIS SOMATICA EN GUANACASTLE (Enterolobium cyclocarpum Griseb.) DEL ESTADO DE COLIMA. Tesis. U.A.Ch. Chapingo, México. p 10-21

- * Dimatoglou, S.; Panagopoulus, I.; Mufios Ferriz, A.; Rhizopoulou, S. (1990) IN VITRO STUDIES OF EMBRYO GROWTH, CALLUS FORMATION AND MULTIPLE BUD INDUCTION OF Pinus pinea L. Journal of plant physiology (Germany, F. R.) (1990) V137(1):58-63
- * Eguiluz P., T. (1985) DESCRIPCION BOTANICA DE LOS PINOS MEXICANOS. Boletin. U.A.Ch. Chapingo, México. p 5-6
- * Eguiluz P., T. (1982) CLIMA Y DISTRIBUCIÓN DEL GENERO Pinus EN MEXICO. Ciencia Forestal V7(38):30-44
- * Eguiluz P., T. (1978) ENSAYO DE INTEGRACION DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE EL GENERO Pinus EN MEXICO. Tesis. U.A.Ch., Chapingo, México. p 15-34
- * Eguiluz P., T. (1977) LOS PINOS DEL MUNDO. Publicaciones Especiales E.N.A. Chapingo, México. p 36-37
- * Ellis D., D. y Webb T., D. (1993) LIGHT REGIMES USED IN CONIFER TISSUE CULTURE. In: M. R. Ahuja (1993) Micropropagation of woody plants. Ed. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. V41(1):31-55
- * Ellison W., T.; Ralph S., C.; Barbour G., M. (1980) BOTANICA. Ed. LIMUSA Universidad de California. Davis, California. 741 p
- * Esau, K. (1972) ANATOMIA VEGETAL. Traducción al español por Pons, R. J. Ed Omega 779 p
- * Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. (1976) PLANT TISSUE CULTURE MEDIA. In vitro. 12(7):473-478.

- * García M., E. y Gómez A., R. (1987) ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE PIÑON EN LOS PIÑONARES DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSI. Agrociencia. (en Prensa).
- * Gates, J., C. y Greenwood M., S. (1991) THE PHYSICAL AND CHEMICAL ENVIRONMENT OF THE DEVELOPING EMBRYO OF Pinus resinosa. American-Journal of Botany. (1991) V78(7):1002-1009
- * Gladfelter H., J. y Phillips G., C. (1987) DE NOV SHOOT ORGANOGENESIS OF Pinus eldarica Medw. IN VITRO: I.-REPRODUCIBLE REGENERATION FROM LONG-TERM CALLUS CULTURE. Plant Cell Rep. Berlin, W. Ger.: Springer International. (1987) V6(3):163-166
- * Go N., E.; Pérez-Orozco G., D.; Halos S., C. (1993) IN VITRO RESPONSE OF EMBRYOS FROM DIFFERENT PROVENANCES OF Pinus caribaea var. Hondurensis Morelet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Netherlands). Jan.(1993) V32(1):1-7
- * Gonzalez G, J. A. (1990) EVALUACION DE LA REGENERACION DE Pinus cembroides Zucc. EN CONDICIONES NATURALES EN LA AMAPOLA, S. L. P. Tesis. U.A.Ch. Chapingo, México. p 1-24
- * Gupta P., K. y Kreitinger, M. (1993) SYNTHETIC SEED IN FOREST TREE. In: M. R. Ahuja (1993) Micropropagation of Woody Plants. Ed. Kluwer Academic Publishers. Boston, London. V41(7):107-119
- * Gupta P., K. y Durzan D., J. (1986) SOMATIC POLYEMBRYOGENESIS FROM CALLUS OF MATURE SUGAR PINE EMBRYOS. Bio/Technology. (1986) V4(1):643-645

- * Halos S., C. y Go N., E. (1993) PROPAGATION OF *Pinus caribaea* Morelet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Netherlands). Jan (1993) V32(1):47-53
- * Hartman H., T. y Kester D., E. (1978) PROPAGACION DE PLANTAS. Traducción al español por Marino, A. A. Ed. CECSA 810 p
- * Hernández R., A. (1984) ANALISIS ESTRUCTURAL PRELIMINAR DE LOS PINONEROS DEL ALTIPLANO POTOSINO-ZACATECANO. Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 7-25
- * Hess, D. (1992) PLANT BIOTECHNOLOGY. Ed. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, Germany. 286 p
- * Hiatt E., N y Allen R., M. (1991) A TISSUE CULTURE SYSTEM FOR MATURE TREE USING SECONDARY WOOD GROWTH FOR EXPLANT MATERIAL. Proceeding Southern Forest Tree. Improvement Conference. (U. S. A.) 1991 No. 21st. p 174-181
- * Hu, C. y Wang, P. (1986) EMBRYO CULTURE. In: Handbook of plant cell culture. Vol. 4 Evans, D. A., Sharp, W. R. y Ammirato P., V. (eds) Mac Millan. p 43-96
- * Jain S., M.; Dong, N; Newton R., J. (1989) SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SLASH PINE (*Pinus elliottii*) FROM IMMATURE EMBRYOS CULTURED IN VITRO. Plant-Science-Limerick. 1989. V65(1):2,233-241
- * Kyte. L. (1987) PLANTS FROM TEST TUBES. Ed Timber Press Inc. Portland, Oregon. 160 p
- * Laine, E. y David, A. (1990) SOMATIC EMBRYOGENESIS IN IMMATURE EMBRYOS AND PROTOPLAST OF *Pinus caribaea*. Plant Science (Ireland) (1990) V69(2):215-224

- * Lanner M., R. (1981) THE PINON PINE: A NATURAL AND CULTURAL HISTORY. University of Nevada Press. Reno Nevada. 208 p
- * Lesney M., S.; Johnson J., D.; KorhnaK, T.; Mc Caffery M., W (1988) IN VITRO MANIPULATION OF SLASH PINE (Pinus elliottii). Genetic manipulation of woody plants/ edited by James W. Hanover and Daniel E. Keathley; technical editors. Claire M. Wilson and Gregory Kuny. New York: Plenum, c1988 p 43-55
- * Leung W., M. D. (1985) ESTUDIOS BIOQUIMICOS EMPLEANDO CULTIVO DE TEJIDOS. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p 67-72
- * Litz R., E. (1991) CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES. [Edited by Roca, W. M.; Mroginski, L. A.] CIAT Publicación No. 151. Cali Colombia. p 295-312
- * López P., C. (1985a) ESTABLECIMIENTO DE UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p 9-13
- *López, P., C. (1985b) MEDIOS DE CULTIVO. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p 15-19

- * López P., C. (1985c) CULTIVO DE EMBRIONES Y OVULOS. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p 49-53
- * López R., C. (1988) MODELOS PARA ESTIMACION DE BIOMASA DE Pinus cembroides Zucc. Tesis U.A.Ch. Chapingo, México. p 1-13
- * Lozoya S., H. (1985) EMBRIOGENESIS SOMATICA. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 33-34
- * Manzo G., A. (1991) RESCATE IN VITRO DE EMBRIONES INMADUROS DE DURAZNO (Prunus persica (L.) Batsch) "Flordaprince". Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 87 p
- * Margara J. (1988) MULTIPLICACION VEGETATIVA Y CULTIVO IN VITRO. LOS MERISTEMOS Y LA ORGANOGENESIS. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 232 p
- * Martínez P., C. (1992) INDUCCION DE ORGANOGENESIS EN COTILEDONES DE Pinus canariensis. Suelo y Planta. (España) (1992) V2(3):385-394
- * Martínez P., C; Harry I., S; Thorpe T., A. (1992) OPTIMIZACION OF BUD INDUCTION IN COTYLEDONARY EXPLANTS OF Pinus canariensis. Plant Cell, Tissue and Organ culture (Netherlands) (Jun, 1992) V29(3):247-255

- * Mondragón M., A. y Olayo M., A. (1985) EL MANEJO DEL PINO PINONERO EN MEXICO. En: Primer Simposium Nacional sobre Pinos Piñoneros. U.A.N.L. Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables. Linares, N.L., México. p 211-214
- * Monnier, M. (1978) CULTURE OF ZYGOTIC EMBRYOS. In: Frontiers of plant tissue culture. Thorpe, T. A. (ed.) University of Calgary Press. Canada. p 277-286
- * Montoya O., J. M. (1990) EL PINO PINONERO. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 98 p
- * Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TABACCO TISSUE CULTURES. *Physiol. Plant.* V15 (1):473-497
- * Neuman, P. R.; Fong, F.; Newton, R. J.; Sen, S. (1992) INDUCTION OF PEROXIDASE ISOZYMES DURING SHOOT ENHANCEMENT BY ABA IN COTYLEDON EXPLANTS OF LOBLOLLY PINE (*Pinus taeda* L.). *Journal of plant physiology* (Germany, F. R.) (1992) V139(3):343-349
- * Niembro R., A. (1988) SEMILLAS DE ARBOLES Y ARBUSTOS (ONTOGENIA Y ESTRUCTURA) Ed. LIMUSA. México p 77-104
- * Niembro R., A. (1986) MECANISMOS DE REPRODUCCION SEXUAL EN PINOS. Ed. LIMUSA. México. 130 p
- * Ochoa A., N. (1985) ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p 25-27

- * Orea C., D. P. y Villalobos A., V. M. (1985) PROPAGACION DE ESPECIES FORESTALES. En; Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 107-112
- * Passini, Marie-Francoise (1982) LES FORETS DE Pinus cembroides S.I. GU MEXIQUE: ETUDE PHYTOGEOGRAPHIQUE ET ECOLOGIQUE/ Paris: Recherche sur les civilisations. 373p
- * Phillips, Roger (1985) LOS ARBOLES. Ed. BLUME. Barcelona, España.
- * Pierik, R. L. M. (1990) CULTIVO IN VITRO DE LAS PLANTAS SUPERIORES. Traducción al español por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p
- * Ramming, D. (1990) THE USE OF EMBRYO CULTURE IN FRUIT BREEDING. Hort Science. V25(4):393-398
- * Rao, A. N. (1977) TISSUE CULTURE IN THE ORCHID INDUSTRY. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Reinert, J. y Bajaj Y., P. S. (eds.) Springer-Verlag. p 44-69
- * Rebolledo V., A. (1982) ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA ECOLOGIA DE LOS PINONARES EN EL ALTIPLANO POTOSINO-ZACATECANO. Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- * Robert, M. F. (1978) UN NOUVEAU PIN PIGNON MEXICAN: Pinus johannis. Adansonia, Ser. V2(18):365-373
- * Robert, M. F. (1977) NOTAS SOBRE EL ESTUDIO ECOLOGICO Y FITOGEOGRAFICO DE LOS BOSQUES DE Pinus cembroides Zucc. EN MEXICO. Ciencia Forestal. V2(10):30-40

- * Robledo, A. y Villalobos A., V. M. (1985) ESTUDIO MORFOGENETICO DE Pinus maximartinezii. En: Memorias del Primer Simposium Nacional sobre Pinos Piñoneros. U.A.N.L. Linares, N.L.
- * Rodriguez C., B. y Porras Ma. del C. (1985) BOTANICA SISTEMATICA. 2a. Edición. Ed. U.A.Ch. D.F., México. 424 p
- * Ruiz-Oronoz M.; Nieto R., D.; Larios R., I. (1958) TRATADO ELEMENTAL DE BOTANICA. Ed. ECLALSA 5a. edición. México, D. F. 730 p
- * Rzedowski, J. (1978) VEGETACION DE MEXICO. Ed. LIMUSA. México, D.F. 432 p
- * SARH (1991) MANUAL DE CONSERVACION DEL SUELO Y DEL AGUA. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 248 p
- * Shabde-Moses, M. y Murashige, T. (1979) ORGAN CULTURE IN Nicotiana PROCEDURES FOR EXPERIMENTAL USE. U.S.D.A. Technical bolletín 1,586. p 40-51
- * Snajberk, K. y Zavarin, E. (1986) MONOTERPENOID DIFFERENTIATION IN RELATION TO THE MORPHOLOGY OF Pinus remota. Biochemical Systematics and Ecology V14(2):155-163
- * Thorpe, T. A. (1988) PHYSIOLOGY OF BUD INDUCTION IN CONIFERS IN VITRO. Genetic Manipulation of Woody Plants/ edited by James W. Hanover and Daniel E. Keathley; technical editors Claire M. Wilson and Gregory Kuny. New York; Plenum c1988 p 167-184

- * Thorpe, T. A. (1978) PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF ORGANOGENESIS IN VITRO. In: Frontiers of plant tissue culture (1978) (T. A. Thorpe, Ed.) University of Calgary Press, Calgary, Canada. p 49-50
- * Van den D, R. (1991) MINERAL NUTRITION. Ed. C.R.C. Press. Boca de Ratón, Florida. U. S. p 169-182
- * Vargas H., J. J. (1982) MORFOGENESIS IN VITRO DE Pinus patula SCHL. Et CHAM. Tesis U.A.Ch. Chapingo, México. p 4-68
- * Villalobos A., V. M. (1985) HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 3-7
- * Villalobos, V. M.; Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. (1983) APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES FORESTALES. Ciencia y Desarrollo Año IX (51):43-59
- * Villegas M. A. (1985) MICROPROPAGACION DE FRUTALES. En: Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. (1985) Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. F.A.O. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 101-106
- * Zavala Ch., F. (1987) ESTUDIO DE LA PRIMERA ETAPA DEL DESARROLLO DE CONOS FEMENINOS DE Pinus cembroides Zucc. Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 1-7
- * Zavarín, E. y Snajberk, K. (1985) MONOTERPENOID AND MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION WITHIN Pinus cembroides. Biochemical Systematics and Ecology V13(2):89-104

* Zel, J. (1993) MICROPROPAGATION OF Pinus sylvestris. In:
M.R. Ahuja (1993) Micropropagation of Woody Plants. Ed
Kluwer Academic Publishers. Boston, London. V41(20):347-
394