

00381

31



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez,  
a partir del cultivo de tejidos de estructuras  
inmaduras**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
( B I O L O G I A )**

P R E S E N T A :

**MARTÍN MATA ROSAS**

278240

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila por compartir su conocimiento conmigo y la oportunidad de trabajar bajo su dirección, pero sobre todo agradezco la gran amistad y ayuda sincera que me ha brindado.
- Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Margarita Collazo Ortega por los consejos y sugerencias realizadas a lo largo del trabajo y a su gran disposición para auxiliarme en cada problema.
- Agradezco al Dr. Robert Bye Boettler el interés mostrado en el trabajo y a las ideas y sugerencias para llevarlo a cabo.
- A los sinodales: Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia; Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco; Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón; Dr. Jorge Isaac Sarquis Ramírez, por sus valiosos comentarios, sugerencias y modificaciones encaminadas a mejorar el presente trabajo.
- Al Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM por permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización del presente trabajo.
- Al Biol. Gerardo Ortiz por su gran orientación y participación en los estudios fisiológicos.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca que me otorgó para cursar los estudios Doctorales.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Académico (PAPIIT) por el apoyo otorgado para la realización del proyecto IN205194.
- Al programa PADEP-Tesis Doctorales 1997 (No. 003337) por el apoyo para la adquisición de reactivos.
- A Bosque Modelo Chihuahua, A.C. por su continua participación en la colecta de material biológico y en las facilidades otorgadas para visitar las poblaciones de *P. chihuahuana*.
- A los amigos y compañeros del Jardín Botánico, Alejandro Martínez, Mario Monroy, Patricia Olgún, Mabel Hernández, Bárbara Estrada, Ana L. López,

## ÍNDICE

• ABREVIATURAS	1
• RESUMEN	2
• SUMMARY	4
• INTRODUCCIÓN	6
• ANTECEDENTES	8
○ Género <i>Picea</i>	10
○ <i>Picea chihuahuana</i> Martínez	10
○ El cultivo tradicional de coníferas	15
○ Cultivo de Tejidos Vegetales	17
○ Cultivo de Tejidos en Coníferas	19
▪ Organogénesis	21
▪ Formación de brotes adventicios	22
▪ Embriogénesis	25
▪ Cultivo de tejidos haploides	26
○ Cambios fisiológicos producidos por el cultivo <i>in vitro</i>	28
○ Oxidación	31
• OBJETIVOS	34
• MATERIALES Y MÉTODOS	35
○ Material biológico empleado	35
○ Medios de cultivo	36
○ Condiciones de incubación	36
○ Cultivo de megagametofitos maduros	37

○ Cultivo <i>in vitro</i> de megagametofitos inmaduros en medio Litz	38
○ Cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros en medio Litz	38
○ Uso de antioxidantes	39
○ Cultivo <i>in vitro</i> de embriones en medio SH	39
○ Discriminación entre los mejores tratamientos de K/2,4-D de los cultivos en medio SH	40
○ Inducción de raíces <i>in vitro</i>	40
○ Cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros de distintas poblaciones	41
○ Efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de los brotes	41
○ Análisis estadístico	42
○ Estudio fisiológico de los brotes de <i>P. chihuahuana</i>	42
▪ Fotosíntesis	42
▪ Clorofilas	43
▪ Peroxidasas	44
▪ Invertasas	44
● RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
○ Cultivo <i>in vitro</i> de megagametofitos maduros.	46
○ Cultivo <i>in vitro</i> de megagametofitos inmaduros en medio Litz	49
○ Cultivos de megagametofitos con baños con solución antioxidante	52

▪ Bajo fotoperiodo	52
▪ En oscuridad	52
○ Cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros en medio Litz	58
○ Cultivo de embriones en medio SH	61
○ Desarrollo de brotes	70
○ Cultivo de embriones en oscuridad	73
○ Cultivo de embriones inmaduros a 29°C	75
○ Discriminación entre los mejores tratamientos de K/2,4-D de los cultivos en medio SH	77
○ Inducción de raíces	80
○ Cultivo de embriones inmaduros de diferentes poblaciones	84
○ Efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de los brotes	86
○ Estudio fisiológico de los brotes de <i>P. chihuahuana</i>	91
○ Fotosíntesis	91
○ Clorofilas	98
○ Peroxidasas	102
○ Invertasas	106
• CONCLUSIONES	110
• APÉNDICES	112
○ 1) Medio Litz	112
○ 2) Medio Schenk y Hildebrandt (SH)	113
• BIBLIOGRAFÍA	115

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalen acético
ANOVA	Análisis de la varianza
BA	N <sup>6</sup> -benciladenina
B5	Medio de Gamborg, <i>et al.</i> , 1968
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
K	Kinetina
Medio Litz	Medio B5 modificado
Litz 50%	Medio Litz al 50 % de su concentración original
Rubisco	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa
SH	Medio de Schenk y Hildebrandt, 1972
SH 50%	Medio SH al 50% de su concentración original
SH15	Medio SH 50% con 15 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
SH10	Medio SH 50% con 10 g l <sup>-1</sup> de sacarosa
SHK	Medio de inducción SH + 5 mg l <sup>-1</sup> de kinetina
tf	Tejido fresco

# Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras.

## RESUMEN

Se indujo la formación de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros de *Picea chihuahuana*, especie endémica y en peligro de extinción. El medio empleado fue el de Schenk y Hildebrandt (SH) adicionado con benciladenina (BA) y kinetina (K), solas o en combinación con ácido  $\alpha$ -naftalen acético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), respectivamente. Los brotes adventicios se formaron principalmente en los cotiledones de los embriones inmaduros, esta respuesta se obtuvo en un amplio rango de concentraciones hormonales. La K fue más efectiva que la BA en la inducción de brotes, las auxinas no jugaron un papel preponderante en este proceso, bajo las condiciones empleadas. A una concentración de 5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina en ausencia de auxina, se logró un mejor desarrollo y un mayor número de brotes adventicios por embrión (11.23). El desarrollo y elongación de los brotes se logró en medio SH al 50% de su concentración original (SH15) sin reguladores del crecimiento y se favoreció aún más con la reducción de la concentración de sacarosa a 10 g l<sup>-1</sup> (SH10). El número de embriones cigóticos inmaduros que respondieron al cultivo *in vitro*, así como, el número de brotes adventicios que formaron, fue diferente dependiendo de la población de procedencia.

La fotosíntesis de las plantas regeneradas *in vitro* estuvo frecuentemente limitada. Se encontró que los embriones inmaduros en la etapa de inducción no

presentaron actividad fotosintética y se vio incrementada en los brotes que fueron subcultivados a SH 50%, encontrando mayor actividad fotosintética a menor concentración de sacarosa ( $10 > 15 > 30 \text{ g l}^{-1}$ ), lo que indica que están pasando de una condición heterotrófica a una fotomixotrófica. La medición de clorofilas también apoyó lo anterior; en este caso se encontró que los brotes cultivados en la menor concentración de sacarosa contenían mayor cantidad de clorofilas. Al analizar el contenido de peroxidasas e invertasas, se observó que la reducción del azúcar realmente promovió el crecimiento, pues el contenido de estas enzimas fue menor. Esto confirmó de manera general que los explantes que se desarrollaron en medio SH10, presentaron mayor capacidad fotosintética y su demanda de sacarosa exógena disminuyó porque aumentó su actividad para fijar  $\text{CO}_2$  atmosférico, lo que promovió su crecimiento.

El enraizamiento de los brotes fue bajo y sólo se logró con un pulso de 24 h en medio con 3 o 5  $\text{mg l}^{-1}$  de ANA. En el proceso de micropropagación de *Picea chihuahuana*, el enraizamiento es aún el paso limitante.

## SUMMARY

Development of adventitious buds was induced from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana*, an endemic Mexican endangered species. The medium used was Schenk and Hildebrandt (SH) supplemented with benzyladenine (BA) and kinetin (K), alone or in combination with  $\alpha$ -naphthalene-acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) respectively. The development of adventitious buds was obtained through a wide range of hormonal concentrations, mainly from the cotyledonary region. K was more effective than BA in the shoots induction; apparently, auxins did not play a primary role in this process. The best induction and development of shoots per embryo (11.23) was obtained with 5 mg l<sup>-1</sup> kinetin without auxin. Shoot development and elongation were achieved on SH medium at 50% of the original concentration (SH15) without growth regulators and improved with the reduction of sucrose concentration to 10 g l<sup>-1</sup> (SH10). The percentage of immature zygotic embryos that responding to *in vitro* culture and the number of adventitious shoots per embryo, were different dependent of the population provenance.

The photosynthetic activity of the *in vitro* plants is frequently limited. It was observed that immature embryos do not show a measurable photosynthetic activity during the induction stage. However, photosynthetic activity was observed in the shoots subcultured on SH 50%, with higher photosynthesis rate at the lower sucrose concentrations (10 > 15 > 30 g l<sup>-1</sup>), indicating that the shoots are changing

from a heterotrophic to a photomixotrophic condition. The quantification of chlorophyll content supported this observation. It was found that the shoots cultured on a lower sucrose concentration had the highest chlorophyll concentration. Analysis of peroxidase and invertase activity showed that the reduction of sugar really promoted growth, since the concentration of the enzymes was low. This confirmed that the explants transferred to SH10 medium had greater photosynthetic capacity and their need for exogenous sucrose decreased due to increase in carbon fixation activity, thus promoting growth.

A low percentage of rooting shoots was obtained with a 24 h pulse in medium added with 3 or 5 mg l<sup>-1</sup> of NAA. In this process of micropropagation of *Picea chihuahuana*, rooting still is the limiting factor.

## INTRODUCCIÓN

El deterioro ecológico que está sufriendo el planeta es alarmante ya que se continúan explotando sus recursos sin que exista una planeación para un manejo sustentable. La tasa de deforestación es muy acelerada; como ejemplo, la vegetación de la zona de los trópicos y en particular las selvas, están desapareciendo a una tasa de 10.5 millones de hectáreas por año (Heywood, 1992). Este proceso, aunado al crecimiento de las fronteras urbanas y agrícolas, ha llevado a una pérdida del material genético de muchas especies vegetales que podría ocasionar su extinción. Estos problemas despiertan la necesidad de plantear soluciones que ayuden a conservar esas especies, de ser posible protegiendo la mayor cantidad de individuos de cada población, los cuales representan parte del material genético de esas especies.

En México la situación no es diferente, existe un deterioro ecológico en casi todos los ecosistemas y los bosques no son una excepción ya que las especies forestales y principalmente las Gimnospermas son utilizadas por las industrias madereras y de celulosa, motivo por el cual éstas han sido sobreexplotadas a tal grado que muchas especies han visto reducida su área de distribución. Tal es el caso de las especies del género *Picea*. En México existen sólo 3 especies de este género, *P. mexicana*, *P. martinezii* y *P. chihuahuana*, esta última es un pinabeto endémico y en peligro de extinción que presenta una distribución limitada a ciertas zonas de los estados de Chihuahua y Durango, requiere de un hábitat muy específico: exposición al norte, sombreado, frío (Ledig *et al.*, 1997)

Este es un claro ejemplo de la necesidad de implementar programas encaminados a conservar germoplasma, así como a tratar de realizar acciones para su rescate y reintroducción a su hábitat.

Dentro de las alternativas de rescate y conservación de germoplasma que se pueden emplear para especies como *P. chihuahuana* se encuentran los métodos de cultivo de tejidos vegetales o técnicas de cultivo *in vitro*. Estas proporcionan una herramienta que podría permitir incrementar la disponibilidad de material biológico empleando diversas estructuras para la regeneración de plantas a partir por ejemplo de material vegetativo como yemas y hojas, así como también embriones cigóticos y megagametofitos (1n); los cuales pueden dar origen a callo, brotes o embriones somáticos. En la conservación de especies escasas en la naturaleza, las técnicas de cultivo de tejidos pueden representar grandes ventajas sobre los métodos convencionales de propagación, pues al aprovecharse la capacidad de propagar vegetativamente árboles seleccionados se estarán clonando tales genotipos (Fay, 1994). Esto debería ser de interés para las industrias, que podrían establecer plantaciones con estos individuos y reducir la necesidad de talar indiscriminadamente poblaciones silvestres.

*P. chihuahuana* necesita de la intervención del hombre para poder garantizar su permanencia, motivo por el cual en el presente trabajo se exploró, mediante las técnicas de cultivo de tejidos, la capacidad regenerativa que poseen los megagametofitos y embriones cigóticos de semillas inmaduras.

## ANTECEDENTES

En las últimas décadas se ha empezado a tomar conciencia de la importancia de estudiar y conservar los recursos naturales para el bienestar de la humanidad y de la continuidad de la vida en el planeta. Las actividades humanas han ocasionado la rápida desaparición de muchas especies, por ejemplo: se calcula que la tasa de deforestación anual es de 800,000 hectáreas por año (Masera *et al.*, 1992, citado por Challenger, 1998). Por lo que debe existir un compromiso mundial para conservar los recursos naturales, sobre todo de aquellos países que cuentan con una gran diversidad biológica.

Los siete países con mayor diversidad biológica o “megadiversidad” son: Brasil, Colombia, México, República Democrática del Congo, Madagascar, Indonesia y Australia (Mittermeier, 1988, citado por Challenger, 1998). México tal vez es el tercer país con mayor diversidad, se calcula que alberga entre el 8 y 12% del total de especies del planeta (Challenger, 1998). Aunque el conocimiento de la flora de México es incompleto, es probable que la riqueza de su flora vascular alcance el cuarto lugar mundial, con al menos 21,600 especies conocidas (Rzedowski, 1993) pero se calcula que pueden llegar a ser de 29,000 a 34,000 especies de plantas (Toledo y Ordoñez, 1993). El endemismo entre plantas vasculares de México es asombroso ya que alcanza 52% o unas 11,440 especies (Rzedowski, 1993). Esta megadiversidad que presenta México se debe a la convergencia de dos zonas biogeográficas, la neártica y la neotropical, además el territorio ha tenido una larga y compleja historia de aislamiento en algunas

regiones, lo que ha favorecido la evolución de un gran número de especies endémicas; además de que presenta una gran variedad de hábitats por la presencia de cadenas montañosas a lo largo y ancho de su territorio (Toledo, 1988).

Las especies endémicas de plantas y animales son los organismos que más atraen la atención de quienes se preocupan por la conservación biológica, pues el hecho de presentar áreas restringidas de distribución y, en muchos casos, poblaciones pequeñas, los vuelven más vulnerables frente a la reducción drástica de los hábitats (Toledo, 1988).

Las Gimnospermas son un grupo de gran importancia biológica, ecológica y económica, poseen alrededor de 65 géneros y 720 especies, distribuidos en cuatro divisiones: Ginkgophyta, Cycadophyta, Pinophyta y Gnetophyta. Dentro de las Pinophytas se encuentra la familia Pinaceae, de la cual en México se han reportado 5 géneros y alrededor de 60 especies (Narave y Taylor, 1997). Dentro de éstas se encuentra *Picea*, un género boreal que incluye de 31 a 50 especies, dependiendo del autor (Ledig *et al.*, 1997), encontradas principalmente en las regiones templadas del norte de Europa, Asia y Norteamérica (Attree *et al.*, 1991). La presencia del género *Picea* en latitudes de México es sorprendente, sólo existe otra especie tan al sur (*P. morrisonicola*) en Taiwan (Ledig *et al.*, 1997). México cuenta con tres especies, *P. martinezii*, *P. mexicana* y *P. chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997).

## **Género *Picea*.**

(Descripción según Martínez, 1948).

Las Piceas son árboles siempre verdes de ramas generalmente extendidas y verticiladas; hojas más o menos rígidas y cuadrangulares, con estomas en las cuatro caras. En algunas especies las hojas son comprimidas y, en tal caso, los estomas se encuentran en dos de las caras. Las hojas están dispuestas en espiral, orientadas en todas direcciones, y se insertan sobre la prolongación de un cojinete; en el árbol duran varios años, pero secas se desprenden fácilmente (Martínez, 1948).

Son plantas monoicas; los conos masculinos constan de numerosos microesporangios con dos sacos poliníferos, están colocados en espiral y se ensanchan en la extremidad figurando una escama. Los conos son colgantes y están formados por numerosas escamas delgadas y persistentes, colocadas en espiral en torno de un eje, y llevan una pequeña bráctea. Las semillas son dos en cada escama y cada una está provista de ala (Martínez, 1948).

### ***Picea chihuahuana* Martínez**

(Descripción según Martínez, 1948).

Nombre común: pinabete, pinoabeto espinoso.

Árboles de 25 a 30 m de altura, con troncos de 45 a 70 cm de diámetro (Figura 1a), con la corteza agrietada, de unos 20 mm de espesor y con la superficie escamosa, de color grisáceo por fuera y moreno oscuro por dentro.

Las ramas inferiores comienzan a partir de los 2 a 5 m de altura sobre el suelo y son casi horizontales, mientras que las superiores son extendidas o algo levantadas, formando una copa cónica. Las ramillas son opuestas, a veces bifurcadas, muy ásperas y de color amarillento con tinte rosado en sus partes tiernas y oscuro en las adultas, las cuales se descaman a medida que envejecen.

Las yemas son terminales, en grupos de tres, ovoide-acuminadas, de 7 a 8 mm, con las brácteas apretadas, ovadas u ovals, de borde lancinado. En la base se observan otras brácteas pequeñas y largamente acuminadas (Fig. 1b).

Las hojas son solitarias, cuadrangulares, rectas o levemente falcadas, de color verde claro y de 15 a 21 mm de largo, más comúnmente de 17 a 19 por 17 mm de ancho, rígidas, con el ápice agudo, córneo y punzante; están colocadas sobre la prolongación de un cojinete recurrente que cuando están secas, se desprenden fácilmente; se encuentran dispuestas en espiral y se orientan hacia la extremidad de las ramillas. Se ven estomas en las cuatro caras formando cuatro hileras en cada una, a veces cinco o seis, pero en este caso una o dos hileras son interrumpidas. Las hojas presentan dos canales resiníferos situados en las extremidades del eje menor.

Los conos masculinos son de forma oval, de unos 3 cm de largo, con microesporas cubiertas antes de la dehiscencia por brácteas ensanchadas que después se prolongan en forma acicular.

Los conos femeninos son terminales o subterminales en las ramas superiores, cilíndricos-oblongos, rectos o a veces encorvados, muy levemente atenuados en la extremidad y romos; colgantes, solitarios o en pares, a veces de

tres a cuatro; de color castaño brillante, miden de 10.5 a 14 cm de largo por 4 de diámetro (abiertos) y están sobre pedúnculos fuertes y encorvados de unos 10 mm (Fig. 1c).

Las escamas son numerosas (unas 150 incluyendo una veintena de pequeñas e infértiles que pertenecen al ápice y a la base del cono); delgadas, coriáceo-leñosas, persistentes; obovado-cuneadas, convexas hacia arriba y aplanadas y oscuras hacia la base, con el borde superior redondeado y entero; miden de 20 a 22 mm de largo por 17-19 mm de ancho y llevan una bráctea dorsal de 4 a 5 mm, irregularmente oval, de color castaño brillante, con el borde erosado, gruesamente laciniado.

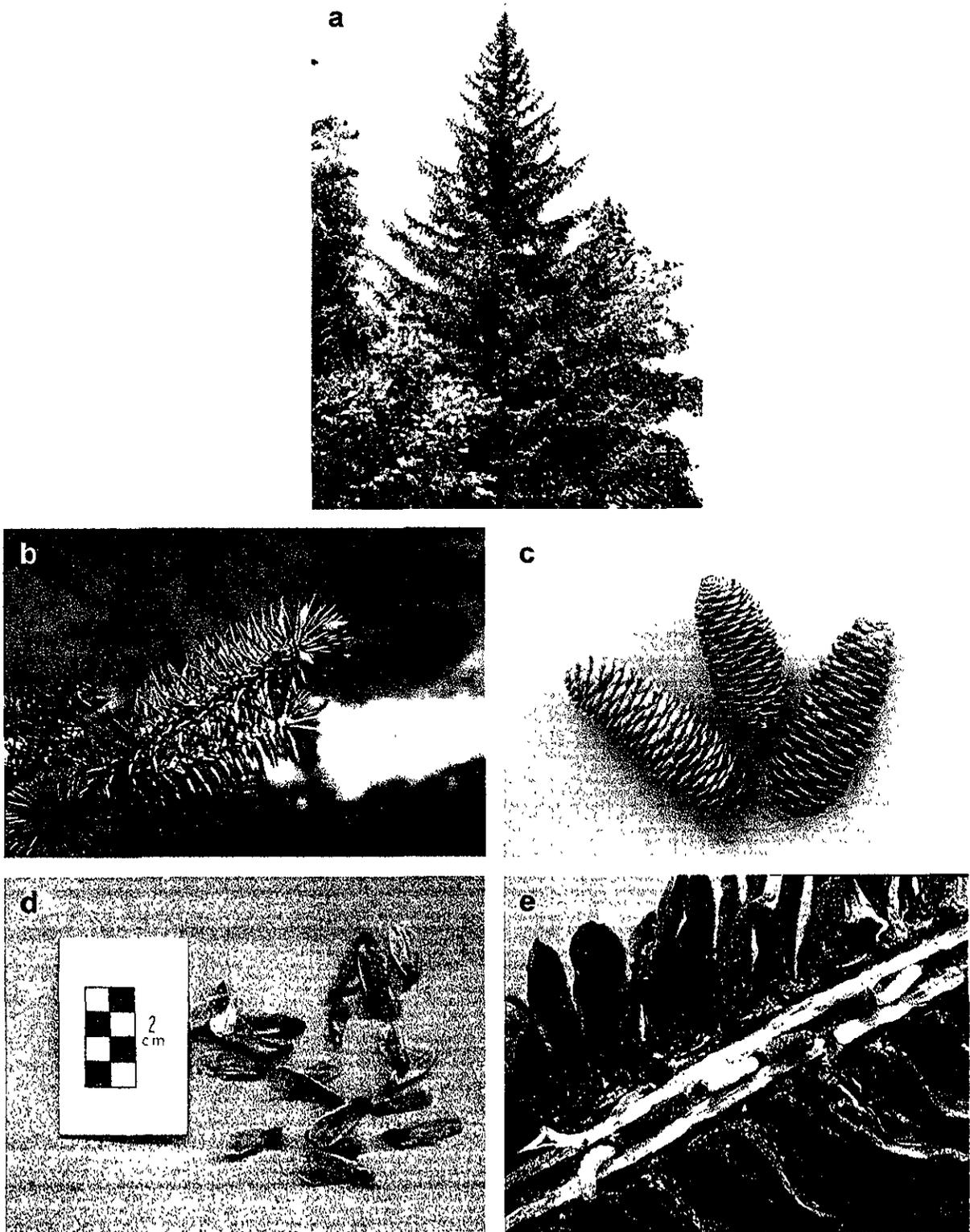
Semilla pequeña, elíptica, subangulosa, atenuada en la base, de color pardo oscuro, con ala casi oval, de 15 a 17 mm de largo incluyendo a la semilla, por 3.5 mm de ancho, de color amarillento a veces levemente rosado, provista de ganchos que sujetan la semilla (Fig. 1d). La madera es dura, blanquizca, algo resinosa.

*P. chihuahuana* es una especie en peligro de extinción cuyo rango de distribución se retiró hacia el norte durante el Holoceno. Esta especie es un elemento menor en la flora de México, pero potencialmente importante desde el punto de vista científico por su contribución única a la biodiversidad de México, y por su valor como recurso genético (Ledig *et al.*, 1997).

Esta especie es de reciente descripción, el primer reporte data de 1942 (Martínez, 1948), presenta una distribución limitada. En la actualidad se conocen 35 localidades en un rango de 800 Km en los estados de Chihuahua y Durango y

está restringida a una elevación entre 2200 y 2700 msnm. Requiere de un hábitat muy específico: se encuentra en pendientes orientadas hacia el norte y en el pie de los arroyos. Asociado al pinoabeto se encuentran varias especies de *Pinus*, *Quercus*, *Abies* y de *Pseudotsuga*. La población de *P. chihuahuana* más pequeña en el estado de Chihuahua cuenta con tan sólo 15 individuos, la más grande con 2241. Solamente tres tienen más de 1000 individuos maduros y en conjunto con las localidades de Durango no llegan a pasar los 20,000 individuos (Ledig *et al.*, 1997).

Esta especie presenta varios problemas que la están llevando a la extinción; uno de ellos es que su reproducción es irregular debido a la distribución heterogénea de edades en la población (Bye, datos no publicados) y casi no existen individuos juveniles y plántulas, con lo que no se está dando una regeneración natural. Además ocurre una significativa pérdida de sus semillas por el ataque de una palomilla (*Cydia phyllisi*, Fig. 1d) (Narváez, 1987 citado por Chaparro, 1992; SARH, 1993). Además, existe una tala ilegal para complementar cargas de celulosa, con la consecuencia de que un mayor número de árboles está desapareciendo. No obstante que *P. chihuahuana* no tiene uso industrial en nuestro país (Narváez *et al.*, 1983; Basurto *et al.*, 1990; citados por Jacob, 1994), en las diferentes poblaciones se hacen cortes de forma clandestina de las puntas de árboles, árboles completos y arbolitos para aprovechar la madera y como arbolito de Navidad (Jacob, 1994). La combinación de estos factores ha provocado que *Picea chihuahuana* se encuentre en inminente peligro de extinción (NOM-059-ECOL-1994; IUCN, 1998).



**Figura 1.** a) Árbol adulto de *P. chihuahuana* en su hábitat, b) Rama lateral de *P. chihuahuana* en donde se pueden observar las tres yemas características de la especie, c) Conos femeninos de *P. chihuahuana*, d) Semillas inmaduras, e) Larvas de *Cydis phyllisi* que infectan los conos de *P. chihuahuana*.

## **El cultivo tradicional de coníferas**

Las coníferas (Pinophyta) son el grupo de mayor importancia económica dentro de las Gimnospermas, cubren aproximadamente el 60% de las áreas forestales del mundo, en las que existen alrededor de 50 géneros y de 300 a 500 especies. Las coníferas son evolutivamente un grupo muy antiguo que apareció en el periodo Pérmico, hace 180 a 205 millones de años; crecen en zonas templadas donde forman densos bosques en Norteamérica, Europa y Asia. Muy pocas especies tienen una distribución estrictamente tropical y en tal caso usualmente se les encuentra en altitudes elevadas en esas regiones (Thorpe y Harry, 1991).

El interés por la regeneración de coníferas es muy grande hoy en día, ya que se reconoce que los bosques son talados a una tasa más rápida de la que se pueden regenerar, ya sea natural o artificialmente, debido al incremento en la demanda de madera y sus productos. Por otro lado, existen enfermedades y plagas, tanto como incendios forestales que amenazan la existencia de algunas especies (Thorpe *et al.*, 1990); en países como México existe una gran apertura de áreas naturales para la agricultura y la ganadería (Challenger, 1998).

Existen dos métodos de propagación de coníferas el sexual y el asexual. El primero, que es el que se presenta sin la intervención del hombre, se basa en el entrecruzamiento de gametos. Esta capacidad de reproducción de los árboles ha sido manipulada por el hombre a través de polinización cruzada y controlada, para realizar el mejoramiento genético tradicional; ésta se realiza mediante la cruce de árboles elite para la producción de semillas mejoradas de alta calidad y poder obtener nuevos individuos de los que a su vez se seleccionarán los mejores.

Desgraciadamente para muchas especies, las semillas mejoradas genéticamente no se pueden producir en abundancia y a bajo costo (Bonga y von Aderkas, 1992).

El otro método es la propagación vegetativa de árboles forestales; una manera de hacerse es mediante el enraizamiento de esquejes o el enraizamiento de fascículos en el caso de los pinos, el otro es mediante injertos. Sin embargo, para la mayoría de las coníferas este tipo de propagación está muy limitado, debido a la pobre respuesta que tienen los esquejes para enraizar, por lo que generalmente no es posible usar estos métodos (Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992). Además de que este tipo de propagación es a largo plazo y exige mucha labor, en algunos casos es muy difícil, con un porcentaje de éxito muy bajo, especialmente con árboles maduros (Attree y Fowke, 1991).

En los bosques, cuando no existe un manejo después de talar los árboles, se deja que las poblaciones se regeneren por sí mismas.

Los métodos de propagación vegetativa han sido practicados por más de 2000 años, pero éstos tienen sus limitaciones, especialmente cuando se requieren grandes cantidades de propágulos. Los métodos de cultivo de tejidos ofrecen una alternativa y han sido exitosamente empleados para muchas especies de árboles (Roa y Lee, 1982)

## **Cultivo de Tejidos Vegetales**

Dentro de las alternativas de rescate y conservación de germoplasma que se pueden emplear para especies como *P. chihuahuana* se encuentran los métodos de cultivo de tejidos vegetales (CTV) o técnicas de cultivo *in vitro*. Estos términos cubren una amplia gama de técnicas que involucran el cultivo bajo condiciones asépticas de una gran variedad de explantes (células, tejidos y órganos); incluye la germinación de semillas, cultivo de meristemas y callos, embriogénesis somática, etc. (George y Sherrington, 1984). Estas proporcionan una herramienta que podría permitir incrementar la disponibilidad de material biológico empleando diversas estructuras para la regeneración de plantas a partir, por ejemplo, de material vegetativo como yemas y hojas, así como también embriones cigóticos e inclusive de tejidos haploides como los megagametofitos y polen.

En la conservación de especies escasas en la naturaleza las técnicas de cultivo de tejidos pueden representar grandes ventajas sobre los métodos de propagación convencionales, pues se puede aprovechar la capacidad de propagación vegetativa de árboles seleccionados, con lo que se podrían clonar tales genotipos (Fay, 1994).

Existen tres tipos de micropropagación: elongación de brotes adventicios, organogénesis y embriogénesis.

La elongación de brotes axilares ocurre cuando éstos, que normalmente están inactivos son liberados de la dominancia apical, principalmente por la manipulación de hormonas (generalmente citocininas) en el medio nutritivo. Este

método de propagación es más común con especies de madera dura (angiospermas) que con coníferas. Se prefiere esta vía de regeneración, ya que mantiene una mayor estabilidad genética que la organogénesis. Las coníferas no son generalmente propagadas por este medio (Bonga y von Aderkas, 1992).

En la organogénesis los brotes adventicios se forman primero, posteriormente se induce el enraizamiento; ocasionalmente las raíces se forman antes que los brotes. En la mayoría de las coníferas la formación de brotes adventicios ocurre en el hipocótilo y cotiledones del embrión y en hojas jóvenes de plántulas (Bonga y von Aderkas, 1992).

La embriogénesis somática fue recientemente posible con unas cuantas especies de árboles, pero rápidamente ha llegado a ser más común. Los embriones somáticos se forman tanto directamente del explante como indirectamente, mediante un callo o en una masa de células comprimida de pequeños embrioides y células semejantes a suspensores. La embriogénesis es generalmente preferida sobre la formación de brotes axilares o de organogénesis cuando uno o unos cuantos genotipos van a ser propagados a gran escala porque:

- 1) La embriogénesis produce una mayor cantidad de propágulos que otros métodos de propagación.
- 2) Esta involucrada menor mano de obra en la embriogénesis que en otros métodos, ya que no se requiere el paso de enraizamiento.
- 3) La encapsulación de embriones somáticos es una realidad, ha permitido la producción de semillas artificiales que facilitan el traspaso de cultivos *in vitro* al campo. Se espera que en un futuro, esta aplicación sea aún mayor (Bonga y von Aderkas, 1992).

## Cultivo de Tejidos en Coníferas

Desde la década de los 30 se han cultivado tejidos de plantas leñosas. En los siguientes 40 años se han establecido cultivos de callos y órganos (Ahuja, 1993). El primer callo de gimnosperma mantenido en continuo crecimiento fue de *Sequoia sempervirens* (Ball, 1950).

Generalmente se prefiere la propagación *in vitro* de árboles maduros sobre la multiplicación vegetativa por medio de plántulas o embriones, porque algunas características importantes no se expresan hasta que los árboles alcanzan su madurez (Bonga, 1981).

La propagación vegetativa de muchas coníferas está limitada por los cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración, que hacen que el tejido maduro no sea capaz de responder a la estimulación morfogénica externa. Esto revela que los órganos y tejidos de las plantas adultas tienen poca plasticidad de desarrollo (Bonga, 1983), muy evidente en el caso de las Gimnospermas, lo que ha conducido a que en la mayoría de las especies que se han logrado propagar vegetativamente se hayan utilizado embriones y en algunos casos tejidos de plántulas. También es altamente deseable llegar a desarrollar técnicas de propagación vegetativa de árboles maduros (Attree y Fowke, 1993).

La mayoría de los trabajos sobre propagación clonal de árboles forestales mediante cultivo de tejidos se han desarrollado a partir de tejido embrionario o de plántula.

De manera general los explantes juveniles como: embriones, cotiledones, hipocótilos o yemas y ápices de plántulas, son los que han respondido mejor a la

regeneración *in vitro* que los tejidos de plantas adultas como por ejemplo las yemas laterales. Por esta razón, los explantes juveniles han sido extensamente empleados para la propagación clonal de especies leñosas (Ahuja, 1993). Aunque el tejido juvenil es la fuente más común de explantes en coníferas, su limitación radica en que éste también sufre de maduración y sólo puede ser capaz de responder a un estímulo organogénico o embriogénico dentro del primer mes después de la germinación (Ellis y Bilderback, 1989).

En estudios sobre micropropagación de especies con poblaciones escasas en la naturaleza es requisito explorar la regeneración a partir de los explantes disponibles. Comúnmente en Gimnospermas se recurre a estructuras ligadas a la semilla (Attree y Fowke, 1993). La micropropagación tiene un gran potencial como se demostró con el hecho de que en los últimos 20 años ha sido posible producir mediante estas técnicas más de 50 Gimnospermas (Thorpe y Harry, 1991) y seguramente esta cifra ha aumentado en la presente década.

La regeneración de coníferas mediante cultivo *in vitro* ha sido reportada en múltiples casos. Hay dos principales patrones de regeneración de plantas completas en Gimnospermas. Uno es vía organogénesis, basada en el enraizamiento de brotes adventicios o axilares, mientras que el otro es vía embriogénesis somática.

El cultivo de tejidos de coníferas puede significativamente incrementar la producción forestal mediante la producción de genotipos seleccionados para características como: tasa de crecimiento más rápida, calidad de madera superior o resistencia a enfermedades. El cultivo de tejidos también podría introducir

nuevas variaciones genéticas y reducir las barreras para entrecruzar especies, asumiendo así un papel preponderante en la biotecnología (Mohammed y Vidaver, 1988).

### **Organogénesis**

Progresos recientes en el cultivo *in vitro* han permitido la propagación vegetativa de muchas coníferas a partir de tejido embrionario o de plántulas y en grado limitado, de brotes (yemas) de árboles maduros. Christianson y Warnick (1985) consideran como competencia a la capacidad del tejido para responder a una inducción organogénica. Los cotiledones de las coníferas son por lo tanto competentes para responder a la inducción organogénica si los brotes *de novo* pueden ser inducidos mediante la exposición a una hormona (Ellis y Bilderback, 1989).

La organogénesis involucra la diferenciación de brotes y raíces a diferentes tiempos durante el desarrollo de las plántulas. Usualmente los brotes son inducidos en un medio enriquecido con citocininas y subsecuentemente éstos son enraizados en un medio con auxina, para completar la formación de las plántulas. La organogénesis ha sido inducida en cultivos de callo, órganos, células y protoplastos. Sin embargo, la organogénesis está influenciada por el genotipo, el estado fisiológico del explante, la edad del explante y las condiciones del cultivo como el régimen de luz y temperatura así como la constitución del medio, en particular la concentración de las hormonas (Ahuja, 1993).

## Formación de brotes adventicios

La producción de brotes adventicios es un proceso que consiste de al menos cuatro pasos distintos:

- a) Inducción de brotes en el explante
- b) Desarrollo y multiplicación de los brotes
- c) Enraizamiento y crecimiento de brotes
- d) Aclimatización de plántulas

En algunos casos los dos últimos pasos pueden combinarse, particularmente cuando el enraizamiento es llevado a cabo *ex vitro*. Los requerimientos óptimos para cada paso deben ser empíricamente determinados, no obstante, quizá los principios generales en los diversos protocolos de regeneración se pueden usar para poder establecer nuevos cultivos (Thorpe y Harry, 1991).

La formación de brotes adventicios involucra una interacción entre el inóculo, el medio y las condiciones ambientales de cultivo. En las coníferas los brotes son generalmente inducidos directamente del explante y no se pasa por una fase de callo. De manera general, el tejido juvenil es el que mejor responde a los tratamientos *in vitro* permitiendo la organogénesis *de novo*, por lo que los embriones son los explantes más frecuentemente usados. Adicionalmente, otros explantes juveniles como cotiledones y epicótilos también son frecuentemente usados, así como brotes laterales de árboles adolescentes y maduros (Thorpe *et al.*, 1990; Thorpe y Harry, 1991).

Se han empleado distintos medios para realizar cultivos *in vitro*. Sin embargo, las sales minerales en su concentración total (original) no siempre son óptimas y diferentes formulaciones pueden funcionar mejor en distintos estados de desarrollo. Se necesita además una fuente de carbono (usualmente sacarosa), vitaminas, nitrógeno reducido (normalmente amino ácidos) y hormonas. Muchos factores ambientales influyen en el crecimiento y diferenciación: la forma física del medio, pH, humedad, composición de la atmósfera gaseosa, luz y temperatura. La mayoría de los cultivos con éxito se han logrado en medio solidificado con agar.

El proceso organogénico involucra la inducción de tejido meristemático mediante el tratamiento con hormonas, aunque la diferenciación y el desarrollo de brotes ocurre frecuentemente en ausencia de hormonas exógenas. La hormona más empleada es N<sup>6</sup>-benciladenina a concentraciones que frecuentemente no son mayores de 5 mg l<sup>-1</sup>, la mezcla de diferentes citocininas provee beneficios en algunos casos. En coníferas, la adición de auxinas u otras hormonas tiende a producir la formación de callo y reduce la organogénesis.

El segundo estado de formación de plantas en coníferas involucra el desarrollo de los primordios para formar brotes con sus hojas primarias y su subsiguiente multiplicación; generalmente la formación de verdaderos brotes requiere la transferencia del explante a un medio con niveles nutricionales y hormonales alterados, y frecuentemente con la adición de carbón activado. En algunos casos, la formación de brotes adventicios se presenta en el cultivo inicial (medio de inducción) y se hace necesario un cambio de medio para la elongación de los tallos. Para la mayoría de los reportes sobre regeneración *in vitro* de

coníferas no son necesarias las hormonas, pero varios subcultivos pueden requerirse para producir brotes que puedan ser enraizados (Thorpe y Harry, 1991).

Las fases de enraizamiento y aclimatización de plántulas pueden ocurrir separadamente o en conjunto, dependiendo si el enraizamiento se lleva a cabo *in vitro* o *ex vitro*. Una gran ventaja de usar ésta última, es que la formación de callo raramente ocurre en la base de los brotes, con lo que se asegura una conexión vascular continua entre el brote y la raíz. El enraizamiento en agar es frecuentemente sincrónico aunque la calidad de las raíces puede no ser tan buena como las que se producen *in vitro* en substratos inertes como agrolita o vermiculita, o bajo condiciones *ex vitro*.

Generalmente se requieren auxinas para el enraizamiento; el ácido indolbutírico (AIB) ha mostrado ser el mejor para tal efecto. Estos tratamientos pueden ser aplicados mediante un pulso (horas o días) o pueden ser continuos. Los polvos comerciales para enraizar también han sido efectivos. En algunos casos el uso de varias auxinas ha mejorado el proceso. Finalmente la concentración de sacarosa y sales minerales frecuentemente debe ser reducida a la mitad o a un tercio del estado previo (Thorpe y Harry, 1991).

La obtención de brotes adventicios se ha logrado en varias especies de coníferas utilizando embriones cigóticos, como ejemplo se pueden citar: 10 especies de *Pinus*, una de *Taxus* y *Pseudotsuga menziesii* (Sommer *et al.*, 1975; Sommer, 1975; Brown y Sommer, 1977, citados por Sommer y Brown, 1977), *Pinus radiata* (Reilly y Brown, 1976, citados por Sommer y Brown, 1977), *Pinus pinaster* (David y David, 1977, citados por Sommer y Brown, 1977), *Thuja*

*occidentalis*, *Cupressus sempervirens*, *C. macrocarpa* y *C. arizonica*. (Sommer y Brown, 1977), *Pinus contorta* (von Arnold y Eriksson, 1980), *P. ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989) y *Picea omorika* (Kolevska y Buturovic, 1995).

## **Embriogénesis**

La micropropagación vía embriogénesis somática *in vitro* involucra el desarrollo de embriones a partir de células somáticas embriogénicamente competentes. En contraste a la organogénesis, donde los brotes y raíces generalmente se desarrollan en diferentes medios, la embriogénesis somática es aparentemente un proceso de un solo paso involucrando el desarrollo de embriones que poseen ambos polos, el brote y la raíz, como en el embrión cigótico. Esto no quiere decir que no requieran diferentes medios para la inducción, desarrollo y maduración de los embriones somáticos

La regeneración de plántulas mediante embriogénesis somática es preferida cuando es posible, porque provee un método efectivo para la propagación rápida de un gran número de plantas. Mientras el número de especies que se han propagado a través de este método ha ido en aumento, el porcentaje de conversión o germinación de los embriones somáticos a plántulas permanece relativamente bajo, por ejemplo en *P. abies*, se ha estimado que menos del 1% de los embriones inducidos se desarrollan en plantas. El éxito en la embriogénesis somática en coníferas está muy limitado al uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes. Si bien existen algunos reportes que han empleado embriones maduros y partes de plántulas disectadas, éstos son

escasos (Attree y Fowke, 1993). El proceso generalmente requiere de auxinas, por ejemplo 2,4-D o ANA, para lograr la inducción de la embriogénesis y se requiere del subcultivo a medio sin auxinas para el desarrollo de un callo embriogénico, que en verdad no es un callo o lo es sólo en forma transitoria y se forma una masa de embriones y suspensores entrelazados. Una vez que el "callo embriogénico" se forma, es posible que se mantenga indefinidamente mediante subcultivos. La continua proliferación de los cultivos embriogénicos en coníferas ocurre por el proceso de poliembriogénesis somática, en el que un embrión da origen a otro y a otro por división sin la formación de callo. Los embriones somáticos en fase cotiledonar usualmente requieren ser transferidos a un medio libre de auxinas y con ABA. El crecimiento de las plántulas en invernadero o en el campo ha representado muchos problemas hasta la fecha, ya que las plantas llegan a presentar un estado de latencia. Al parecer, la deshidratación parcial de las plántulas puede ayudar a superar el problema (Thorpe y Harry, 1991).

La formación de embriones somáticos ha sido observada por ejemplo en *Picea abies*, *P. glauca*, *Pinus taeda*, *Larix decidua*, *Abies alba* (Schuller et al., 1989).

### **Cultivo de tejidos haploides**

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* es posible emplear diferentes explantes. Entre ellos se encuentran las estructuras haploides de gran importancia en los procesos de mejoramiento de cultivos mediante la producción de plantas diploides homocigas y para análisis genéticos. Estos estudios en conjunción con

las técnicas electroforéticas, abren la posibilidad de identificar genotipos menos frecuentes y de reconocer la presencia de genes hasta entonces encubiertos por genes dominantes los cuales se podrían manifestar si se lograra regenerar plantas haploides. No obstante la importancia que esto representa para el manejo de los bosques, en las Gimnospermas existen pocos reportes sobre la regeneración de estructuras organizadas a partir de tejidos haploides (Singh *et al.*, 1981). Únicamente se han producido plantas a partir de megagametofitos y los estudios exitosos son pocos (Rohr 1987, Bonga *et al.*, 1988, citados por Bonga y von Aderkas, 1992).

Se han obtenido embriones somáticos de coníferas a partir de megagametofitos de *Larix decidua* y *L. x eurolepis* (Attree y Fowke, 1993). Así también se logró la formación de embriones somáticos a partir de megagametofitos en varias especies de cícadas como *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea*, *Z. pumila* (Chávez *et al.*, 1992b); *Ceratozamia hildae* y *C. mexicana* (Chávez *et al.*, 1992a). En una revisión sobre la embriogénesis somática en Gimnospermas, Attree y Fowke (1993) indican que existen además otros estudios con cícadas (*Cycas circinalis*, *Zamia pumila*) en los que se logró el desarrollo de embriones somáticos a partir de megagametofitos. También se ha reportado la formación de plántulas haploides vía organogénesis a partir de gametofitos femeninos de *Ephedra foliata* a partir de cultivo *in vitro* (Singh *et al.*, 1981).

Existen pocos reportes sobre la regeneración de plantas haploides en Gimnospermas, lo que hace pensar que deberán superarse múltiples dificultades

para lograr inducir respuestas morfogénicas a partir de los megagametofitos de *P. chihuahuana*.

### **Cambios fisiológicos producidos por el cultivo *in vitro***

Las respuestas que se obtienen mediante el cultivo de tejidos dependen de diversos factores, principalmente del genotipo del material vegetal (explante) a cultivar, de los diversos componentes de los medios de cultivo, de los reguladores del crecimiento y de los factores ambientales o físicos, que son las condiciones bajo las cuales se desarrollan los cultivos (George y Sherrington 1992). Pero los cultivos que crecen heterotrófica o fotomixotróficamente *in vitro* en sustratos solidificados con agar pueden presentar modificaciones tanto en su estructura como en sus funciones fisiológicas del aparato fotosintético, es decir, la actividad fotosintética de las plántulas desarrolladas está frecuentemente limitada como resultado de su condición particular: baja irradiación durante el periodo luminoso, altos niveles de sacarosa, una humedad relativa alta, incremento de la concentración de etileno y baja disponibilidad de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones pueden afectar su desarrollo y el éxito para la posterior aclimatización *ex vitro* (Serret *et al.*, 1996; Čatsky *et al.*, 1995). La habilidad fotosintética de las plántulas cultivadas *in vitro* necesita ser confirmada mediante la medición del intercambio de CO<sub>2</sub>. Diversos métodos se han desarrollado para varias especies como fresa, papa, tabaco y rosa (Triques *et al.*, 1997).

El confinamiento de las plantas durante el cultivo *in vitro* en recipientes cerrados puede ocasionar modificaciones dramáticas en la composición gaseosa

de la atmósfera. Productos volátiles como el etileno se pueden acumular e inhibir el crecimiento vegetal y el desarrollo de la fotosíntesis. En cultivos fotosintéticamente activos que crecen fotomixotróficamente bajo un régimen de luz/oscuridad en recipientes cerrados, el CO<sub>2</sub> se acumula en el periodo de oscuridad y es consumido en el de luz, con lo que, a largo plazo, el CO<sub>2</sub> puede alcanzar concentraciones muy altas cuando la fijación de CO<sub>2</sub> no balancea la pérdida por la respiración y puede ocurrir el agotamiento de oxígeno. Por otro lado, dependiendo de la actividad fotosintética de los explantes, la concentración de CO<sub>2</sub> puede disminuir al punto de compensación durante el periodo de luz, con lo que la fotosíntesis es cercana a cero, en esta caso, la ganancia de carbono a partir de la fijación de CO<sub>2</sub> es limitada y únicamente se obtiene por la utilización de la sacarosa, con lo que la ganancia puede ser muy pequeña (Cournac *et al.*, 1991). La considerable limitación en la fotosíntesis neta se traduce en una limitación similar en la tasa de crecimiento medida como tasa de acumulación de materia seca (Čatsky *et al.*, 1995). El agotamiento o exceso de CO<sub>2</sub> también puede causar efectos deletéreos sobre las plántulas *in vitro* y puede ser la causa de crecimientos anormales durante el estado de desarrollo *in vitro* o durante la aclimatización (Cournac *et al.*, 1991).

Se ha involucrado al azúcar presente en la mayoría de los medios de cultivo como uno de los principales responsables en la represión del desarrollo de cloroplastos y se ha demostrado que el suministro de azúcar exógeno tiende a reducir la fotosíntesis neta (LaRosa *et al.*, 1984; Van Huylenbroeck y Debergh, 1996).

Al mejorar la eficiencia fotosintética de las plántulas *in vitro* se puede mejorar las condiciones de crecimiento en los cultivos y también favorecer el éxito de la aclimatización *ex vitro*. Se ha considerado que los brotes y plántulas *in vitro* tienen una pequeña o baja habilidad fotosintética para proveer un balance de carbono positivo, por lo que requieren azúcar como fuente de carbono y de energía para su crecimiento hetero o mixotrófico durante las fases de multiplicación y enraizamiento. Investigaciones recientes han revelado que las plántulas *in vitro* pueden desarrollar crecimiento fotoautotrófico bajo condiciones favorables para la fotosíntesis. Esto se ha logrado modificando factores como los niveles de sacarosa en el medio, la intensidad luminosa y la concentración de CO<sub>2</sub> (Serret *et al.*, 1996).

Existe evidencia de que los cloroplastos de plántulas cultivados *in vitro* pueden ser funcionales, lo que ha permitido en algunos casos inducir un crecimiento fotoautotrófico. Sin embargo, las células y tejidos fotoautotróficos no han sido usados extensamente debido a la dificultad de establecer y mantener los cultivos. Varios intentos para inducir células o tejidos heterotróficos a crecer fotoautotróficamente mediante la omisión de azúcares del medio de cultivo no han sido exitosos.

A fin de crecer células fotoautotróficamente ha sido necesario alterar las condiciones de cultivo mediante el incremento de los niveles de CO<sub>2</sub> y la intensidad de luz. Otros factores pueden también influenciar el desarrollo de la capacidad fotoautotrófica en células cultivadas, como la fuente del explante, la

fuentes de carbono, el tipo y la concentración de los reguladores del crecimiento, así como la interacción de todos ellos (LaRosa *et al.*, 1984).

## **Oxidación**

La oxidación de los cultivos *in vitro* es un problema frecuente, ésta puede ocurrir en respuesta a la disección o al cultivo posterior. Generalmente, la oxidación trae como consecuencia un crecimiento reducido y la muerte eventual del tejido (Bonga y von Aderkas, 1992).

La oxidación del tejido afecta su metabolismo de varias maneras. Se la ha asociado con el incremento en la síntesis de proteínas y almidón y una disminución en la producción de etileno. Cuando la oxidación llega a ser muy intensa, la síntesis de proteínas disminuye y comienza el deterioro del tejido.

La oxidación del tejido es autocatalítica. Los exudados fenólicos tóxicos producen daños, los cuales crean más exudados y por lo tanto mayor oxidación. Se puede añadir carbón activado al medio de cultivo para atrapar los exudados, pero esto puede interferir con la efectividad de las hormonas adicionadas al medio ya que también las absorbe (Bonga y von Aderkas, 1992).

Los explantes frecuentemente se tornan cafés o negros rápidamente después de aislarlos y cuando esto ocurre el crecimiento se inhibe y el tejido frecuentemente muere. La inhibición del crecimiento es más severa en las especies que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles. Los tejidos provenientes de plántulas son menos propensos a la oxidación por disección que los tejidos de plantas adultas. La oxidación también

esta influenciada por el estado fisiológico del explante, ya que se ha visto que explantes tomados de una planta en diferentes meses pueden o no presentar oxidación.

La necrosis del tejido ocurre por la acción de las enzimas oxidasas que contienen cobre tales como la polifeniloxidasas y la tirosinasa (Lerch, 1981, citado por George y Sherrington, 1984), las cuales son liberadas o sintetizadas en el momento que los tejidos son dañados. Los sustratos de estas enzimas varían en cada tejido, siendo los más comunes la tirosina o o-hidroxi-fenoles como el ácido clorogénico. Las enzimas y sustratos son normalmente retenidos dentro de diferentes compartimientos de las células y se liberan cuando éstas son dañadas o están moribundas. Los fenoles tienen una función natural importante en la oxidación regulada del AIA. La toxicidad de los fenoles se debe probablemente a la unión reversible del hidrógeno a las proteínas. La inhibición irreparable del crecimiento se presenta cuando los fenoles son oxidados a compuestos quinona altamente activos, polimerizan y/o oxidan proteínas para formar de manera creciente compuestos melánicos (George y Sherrington, 1984).

La oxidación del tejido, especialmente del explante aislado se puede prevenir de varias maneras, con mejores resultados en unas que otras. En algunos casos se necesita la conjunción de dos o más y en los casos más severos es muy difícil prevenirla. La primera acción es remover las sustancias fenólicas de los explantes, las cuales son frecuentemente exudados del tejido. Para ello se realizan lavados en agua corriente, antes de que los explantes sean esterilizados; también se usa dejarlos algunos minutos en agua estéril antes de la disección del

material. Una de las acciones más comunes para contrarrestar la oxidación son los subcultivos frecuentes. En las transferencias de cultivo a intervalos frecuentes las partes necrosadas del tejido pueden removerse antes de que afecten al tejido sano (Bonga y von Aderkas, 1992).

Otra de las acciones para combatir la oxidación es la adición de carbón activado, que tiene una gran capacidad para absorber compuestos tóxicos e inhibitorios; generalmente se emplea en concentraciones de 0.5 a 3 g l<sup>-1</sup>. Otros compuestos como: la cafeína, el polivinilpirrolidona (PVP) y el β-mercaptoetanol han mostrado ser benéficos para la absorción de polifenoles o taninos. El PVP absorbe fenoles a través de la unión con el hidrógeno, previniendo su oxidación (George y Sherrington, 1984).

La tendencia de los compuestos a oxidarse o reducirse depende del potencial oxidación-reducción (redox) de la solución. Cuando los tejidos son susceptibles a la oxidación, éstos frecuentemente se sumergen en una solución de un agente reductor (antioxidante) inmediatamente después de su disección. La lista de compuestos útiles que se han usado para este propósito incluye al ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteina HCl, ditioneitol (DTT) y mercaptoetanol. También se han incorporado agentes reductores dentro del medio de cultivo (George y Sherrington, 1984).

La exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los fenoles. Para reducir o prevenir la oxidación, los cultivos se mantienen en oscuridad por más de 14 días antes de ser transferidos a bajas intensidades de luminosa (George y Sherrington, 1984).

## OBJETIVOS

- 1) Inducir respuestas morfogénicas (callo, raíces, brotes y/o embriones) *in vitro* a partir de megagametofitos provenientes de **semillas maduras** de *Picea chihuahuana*.
- 2) Inducir respuestas morfogénicas (callo, raíces, brotes y/o embriones somáticos) *in vitro* a partir de megagametofitos y embriones provenientes de **semillas inmaduras** con la intención de llegar a regenerar plántulas completas haploides y diploides de *Picea chihuahuana*.
- 3) Determinar si existe una respuesta diferencial en el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* provenientes de distintas poblaciones
- 4) Evaluar el efecto de la sacarosa sobre la condición fisiológica de los brotes adventicios de *P. chihuahuana* obtenidos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico empleado

Para los distintos experimentos se utilizaron semillas maduras así como inmaduras provenientes de conos sin abrir, recolectadas y donadas por Bosque Modelo Chihuahua, A.C., provenientes de varias localidades del estado de Chihuahua. Las semillas se extrajeron de los conos y se almacenaron en refrigeración a 6°C hasta el momento de su uso. Para cada caso las semillas se esterilizaron superficialmente siguiendo los pasos que se mencionan a continuación.

- 1) Se enjuagaron con agua destilada por 20 min con el fin de eliminar las partículas adheridas a ellas.
- 2) Se desinfectaron con una solución de captan ( $2.5 \text{ g l}^{-1}$ ) y 6 gotas/100 ml de un microbicida comercial (plata coloidal 0.32%) por 24 horas.
- 3) Se desinfectaron con alcohol etílico al 70% en agitación durante 2 min.
- 4) Se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro activo) al 20% (v/v), adicionado con 3-5 gotas de Tween 80, durante 30 min.
- 5) Finalmente bajo condiciones asépticas se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada.

Con las semillas ya esterilizadas, se procedió bajo condiciones asépticas a su disección con la ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumental de disección. Se retiró la testa tratando de no dañar al megagametofito, a éste se le realizó un corte para separarlo longitudinalmente en dos partes y poder extraer al embrión.

Los explantes utilizados fueron megagametofitos de semillas maduras, de semillas inmaduras y embriones de estas últimas.

### **Medios de cultivo**

Se emplearon los medios de cultivo B5 (Gamborg, *et al.*, 1968) modificado por Litz (Litz, 1995; Chávez *et al.*, 1992a,b) al que se le llamará medio Litz de aquí en adelante (apéndice 1) y el medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) (apéndice 2). Los medios se vertieron en cajas de Petri (20X100 mm) o frascos de vidrio de 120 ml de capacidad, conteniendo de 20 a 25 ml de medio. A todos los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.7 con NaOH y HCl 0.1 N previo a la adición de Agar 8 g l<sup>-1</sup>. Los frascos de cultivo con medio nutritivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C, 15 lb psi<sup>-1</sup> durante 17 min.

### **Condiciones de incubación**

Para cada experimento la mitad de los explantes se incubaron en una cámara de crecimiento a 26±2°C; la mitad se colocó en oscuridad y la otra mitad en fotoperiodo de 16 h luz, con una densidad de flujo fotónico de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, proporcionada por dos lámparas Luz de día General Electric de 75 W. Solamente

en un ensayo se incrementó la temperatura a 29°C y a una densidad de flujo fotónico de 160  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### Cultivo de megagametofitos maduros

Se sembraron mitades de megagametofitos en cajas Petri adicionadas con medio Litz con diferentes concentraciones de BA/ANA y K/2,4-D (Cuadro 1). Se sembraron de 5 a 10 explantes por caja con cuatro repeticiones para cada tratamiento.

Después de 30 días de inducción la mitad de los explantes se subcultivaron a sus respectivos medios de inducción, la otra mitad se transfirió a medio Litz al 50% de sus componentes sin reguladores del crecimiento. Posteriormente se realizaron subcultivos mensuales.

**Cuadro 1.** Tratamientos hormonales adicionados al medio Litz para el cultivo *in vitro* de megagametofitos y embriones de *P. chihuahuana*.

		BA o K ( $\text{mg l}^{-1}$ )						
		0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
ANA o 2,4-D ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0.1							
	0.5							
	1.0							
	2.0							
	3.0							
	4.0							
	4.0							

### **Cultivo *in vitro* de megagametofitos inmaduros en medio Litz**

A partir de semillas inmaduras colectadas en agosto de 1995 de las poblaciones de La Tinaja y El Ranchito (Chihuahua). Se sembraron megagametofitos en medio Litz adicionado únicamente con ocho distintas combinaciones de citocininas BA o K y auxinas ANA o 2,4-D (0/0, 5/0, 3/0, 1/3, 1/2, 1/1, 0.5/2 mg l<sup>-1</sup>). Se seleccionaron estos tratamientos con base en los resultados obtenidos con megagametofitos de semillas maduras. Se colocaron dos explantes por frasco de vidrio con diez repeticiones.

El tiempo de inducción fue de 30 días y posteriormente se transfirieron a medio Litz 50%; los subcultivos subsecuentes se realizaron cada treinta días.

### **Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros en medio Litz**

Se utilizaron conos inmaduros, es decir, aquellos que todavía estaban cerrados, para lo cual hubo que abrirlos mecánicamente y extraer las semillas, las cuales se almacenaron en refrigeración (6°C) para su posterior procesamiento.

Los embriones se sembraron en medio Litz. Se aplicaron 49 distintos tratamientos para cada juego hormonal (Cuadro 1). Se sembraron 4 embriones por contenedor con 5 o 6 repeticiones para cada tratamiento.

El tiempo de inducción fue de 30 días y posteriormente se transfirieron a medio Litz 50%; los subcultivos subsecuentes se realizaron cada treinta días.

## **Uso de antioxidantes**

Para tratar de evitar o minimizar la oxidación, se utilizaron dos compuestos que han demostrado un efecto antioxidante en los cultivos *in vitro* con el medio SH, el ácido ascórbico y el ácido cítrico. Se preparó una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico ( $250 \text{ mg l}^{-1}$ ), se le ajustó a un pH 5.8 y se esterilizó por filtración con la ayuda de filtros Millipore ( $0.45 \mu\text{m}$ ) (debido a que ambos compuestos son termolábiles) y se le adicionó, bajo condiciones asépticas, al medio de cultivo después de que éste salió de la autoclave y alcanzó una temperatura de  $40\text{-}50^\circ\text{C}$ , posteriormente se vació en cajas Petri ( $20 \times 100 \text{ mm}$ ) y/o frascos de vidrio de 120 ml de capacidad.

En cada subcultivo de los explantes (embriones y megagametofitos), se les aplicó un baño con la una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico ( $300 \text{ mg l}^{-1}$ ) pH 5.8. Los explantes se colocaron en frascos de vidrio que contenían 15 ml de la solución antioxidante por lapsos de 15 a 20 min, posteriormente fueron subcultivados en medio SH 50% y se colocaron bajo las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas.

## **Cultivo *in vitro* de embriones en medio SH**

Los embriones de semillas inmaduras se sembraron en medio SH. Se tomaron como base los mejores resultados obtenidos en los tratamientos con medio Litz para ensayar los siguientes tratamientos de los juegos de reguladores del crecimiento BA/ANA y K/2,4-D: 0/0, 5/0, 3/0, 1/1, 1/2, 1/3, 0.5/2, 2/1  $\text{mg l}^{-1}$ . Para cada tratamiento se sembraron 10 a 12 embriones.

Después del primer mes de cultivo en los medios de inducción, los explantes se transfirieron a medio SH basal al 50% de su concentración con el fin de promover la morfogénesis; se realizaron subcultivos cada 30 días.

### **Discriminación entre los mejores tratamientos de K/2,4-D de los cultivos en medio SH**

Debido al número relativamente bajo de embriones en el ensayo inicial y a la variación de resultados, se realizó otra experimento para tratar de establecer diferencias entre las mejores cuatro combinaciones de K/2,4-D (5/0, 3/0, 2/1 y 1/2 mg l<sup>-1</sup>) que formaron el mayor número de brotes en el primer ensayo, para lo cual se sembraron 30 embriones por cada tratamiento, los embriones fueron cultivados siguiendo el procedimiento ya descrito.

A los cuatro meses de iniciado el experimento se evaluó el número de brotes formados por embrión y por tratamiento.

### **Inducción de raíces *in vitro***

Para tratar de inducir la formación de raíces en brotes adventicios se colocaron de 15 a 20 brotes individualizados (10-40 mm altura) en medio SH 50% sólido y/o líquido, adicionado con AIB 3 mg l<sup>-1</sup>; el periodo de inducción fue de 24 h, otros brotes de colocaron en los mismos medios pero con ANA 3, 5 o 10 mg l<sup>-1</sup>, durante 24 o 48 h.

A la mitad del número total de brotes se les realizó un corte transversal en la parte basal para facilitar la penetración de la auxina.

Posteriormente los brotes fueron subcultivados a medio SH 50% líquido sin reguladores del crecimiento. Los resultados se registraron al término de 2 meses.

### **Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de distintas poblaciones**

Se utilizaron semillas inmaduras de cuatro poblaciones de *P. chihuahuana*, El Ranchito, Louisiana, La Tinaja y Las Trojas, del estado de Chihuahua.

Los embriones se sembraron en medio SH adicionado únicamente con 5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina. Para cada lote de semillas (población) se utilizaron alrededor de 300 semillas y se sembraron 7-8 explantes por frasco.

Después del primer mes de cultivo en los medios de inducción (SH con 5 mg l<sup>-1</sup> K) los explantes se transfirieron a medio SH basal al 50% (SH15) de su concentración con el fin de promover la morfogénesis y se realizaron subcultivos periódicos cada 15 días para tratar de elongar los brotes que se formaron.

Después de dos subcultivos en medio SH15, la mitad de los embriones se les transfirió a medio SH basal 50% con sacarosa 10 g l<sup>-1</sup> (SH 10), mientras que la otra mitad se continuo subcultivando en SH15.

A todos los medios se les aplicó el tratamiento con los agentes antioxidantes.

### **Efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de los brotes**

Después del periodo de inducción de brotes (30 días), el desarrollo medido como grado de diferenciación y elongación de los brotes fue muy lento; por tal motivo, se decidió realizar un ensayo modificando el contenido de sacarosa del

medio de desarrollo (SH al 50% de sus componentes) reduciéndolo de  $15 \text{ g l}^{-1}$  (SH15) a  $10 \text{ g l}^{-1}$  (SH10). Los embriones fueron sembrados en el medio de inducción (30 días), posteriormente fueron subcultivados a medio SH15 durante 30 días; finalmente, la mitad del número total de embriones se subcultivaron a medio fresco SH15 y la otra mitad a SH10. Se realizaron subcultivos cada 30 días. Se registraron tanto el número de brotes por embrión, así como la altura alcanzada por éstos, los registros se tomarán al término de 3 meses de cultivo.

### **Análisis estadístico.**

Para la discriminación entre los mejores tratamientos para la inducción de brotes adventicios, para el cultivo de embriones de cuatro poblaciones, así como, para los estudios fisiológicos, se utilizó el análisis de varianza mediante la ayuda del paquete estadístico Statgraphics ver. 4.0. Se trabajó con un nivel significativo del 95%, el rechazo o la aceptación de la hipótesis nula (no existe diferencia significativa) se determinó mediante la probabilidad de  $p$ , es decir, si la  $p \geq 0.05$  no hay diferencia significativa. En donde se pudo establecer diferencias significativas se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey HSD.

### **Estudio fisiológico de los brotes de *P. chihuahuana***

#### **Fotosíntesis**

Se midió la fotosíntesis mediante un analizador de gases modelo IRGA CI-30, U.K. a un flujo de  $0.3 \text{ l h}^{-1}$ , en sistema semicerrado y empleando el aire del cuarto de crecimiento como fuente de  $\text{CO}_2$ , a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y una

densidad de flujo fotónico de  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La medición se realizó colocando para cada caso los embriones en una cámara para hoja, la lectura se tomó a los 60 segundos de flujo. Se analizaron muestras de 9 diferentes tiempos de cultivos *in vitro*, en cada caso se realizaron de 3 a 5 repeticiones empleando de 7-8 embriones con brotes adventicios en cada caso.

### Clorofilas

El contenido de clorofila se determinó cuantitativamente mediante un macerado de brotes adventicios (3 a 5 repeticiones) en acetona al 80% (3 ml). El extracto se centrifugó a 14,000 g durante 10 min, se colectó el sobrenadante para leerse espectrofotométricamente a 647 y 664 nm. Utilizando las ecuaciones de Coombs *et al.* (1988), se calculó la concentración de clorofilas a, b y total; con estos datos se determinó la proporción de a/b.

$$\text{Ca } (\mu\text{M}) = 13.19 \times A_{664} - 2.57 \times A_{647}$$

$$\text{Cb } (\mu\text{M}) = 22.10 \times A_{647} - 5.26 \times A_{664}$$

$$\text{CT } (\mu\text{M}) = 7.93 \times A_{664} + 19.53 \times A_{647}$$

Donde Ca = clorofila a; Cb= clorofila b; CT= clorofila total;  $A_{647}$ = absorbancia a 647 nm;  $A_{664}$ = absorbancia a 664 nm

## **Peroxidasas**

Los embriones (8-10) provenientes de cultivo *in vitro* se maceraron en 3 ml de buffer de fosfatos 10 mM (pH 6.6), se centrifugaron a 14,000 g durante 10 min, se extrajo el sobrenadante que se utilizó para medir las peroxidasas solubles conservándolo a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 1.5 ml de buffer de fosfatos NaCl 1 M incubándolo durante 2 h a 30°C. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se empleó para la determinación de peroxidasas unidas a pared celular.

Para determinar la actividad de peroxidasas solubles y unidas a pared celular dependientes de guayacol se empleó el método de Zheng y Van Huystee (1992). La reacción se desarrolló empleando 1 ml de muestra adicionada con 1 ml de buffer de fosfatos 10 mM, pH 6.2, 0.05 ml de guayacol 1% y 0.05 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% (v/v). La reacción se siguió espectrofotométricamente a 470 nm durante 2 min a 30°C. A partir de los datos se obtuvo la velocidad inicial de reacción. Cada ensayo se repitió de 3 a 5 veces.

## **Invertasas**

Los embriones (7-8) provenientes de cultivo *in vitro* se maceraron en 3 ml de buffer de fosfatos 10 mM (pH 6.6), se centrifugaron a 14,000 g durante 10 min, se extrajo el sobrenadante el cual se utilizó para medir las invertasas solubles, conservándolo a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1.5 ml de buffer de fosfatos NaCl 1 M incubándolo durante 2 h a 30°C. Se centrifugó nuevamente y el

sobrenadante se empleó para la determinación de invertasas unidas a pared celular.

La determinación de la actividad de invertasas solubles y unidas a pared se realizó de la siguiente manera: para la determinación de la glucosa inicial, se colocó 0.5 ml de muestra en un tubo de ensaye al cual se le adicionó 0.5 ml de reactivo de cobre, se colocaron en ebullición en un baño María durante 10 min, posteriormente se le añadió 0.5 ml de reactivo de Arsenomolibdato y se aforó a 5 ml con agua destilada. La mezcla resultante se leyó a 653 nm.

Para la determinación de la glucosa final se empleó 0.5 ml de la muestra a la cual se le adicionó 0.5 ml de sacarosa 1%, se dejó por 5 min en agitación para permitir que la invertasa pudiera hidrolizar la sacarosa en fructosa y glucosa; posteriormente se tomó 0.5 ml de la solución y 0.5 ml de reactivo de cobre, la mezcla se colocó en ebullición en baño María durante 10 min, posteriormente se le añadió 0.5 ml de reactivo de Arsenomolibdato y se aforó a 5 ml con agua destilada. La mezcla resultante se leyó a 653 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivo *in vitro* de megagametofitos maduros

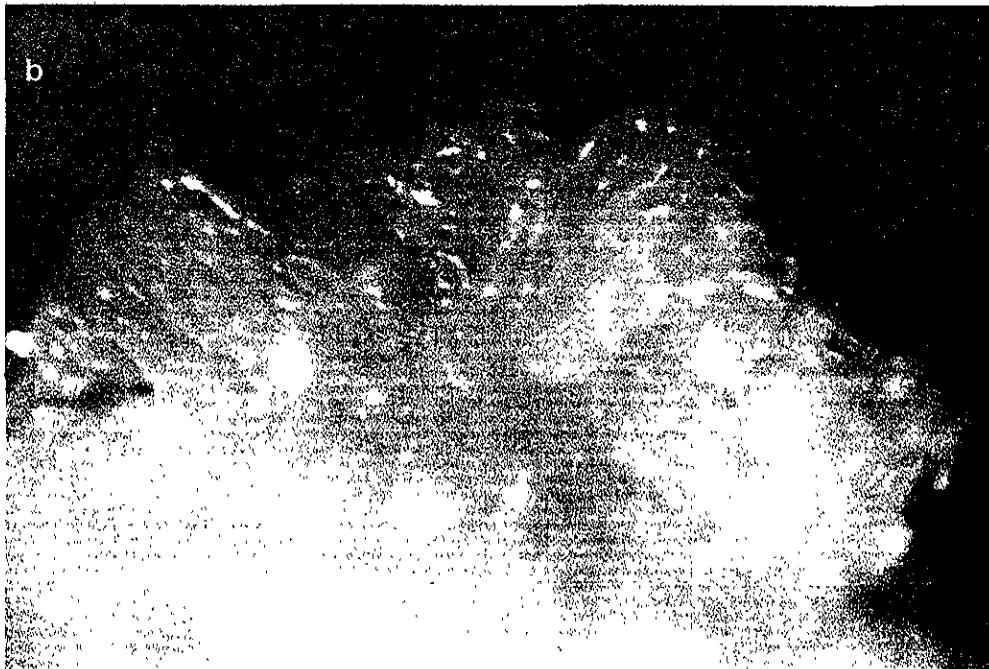
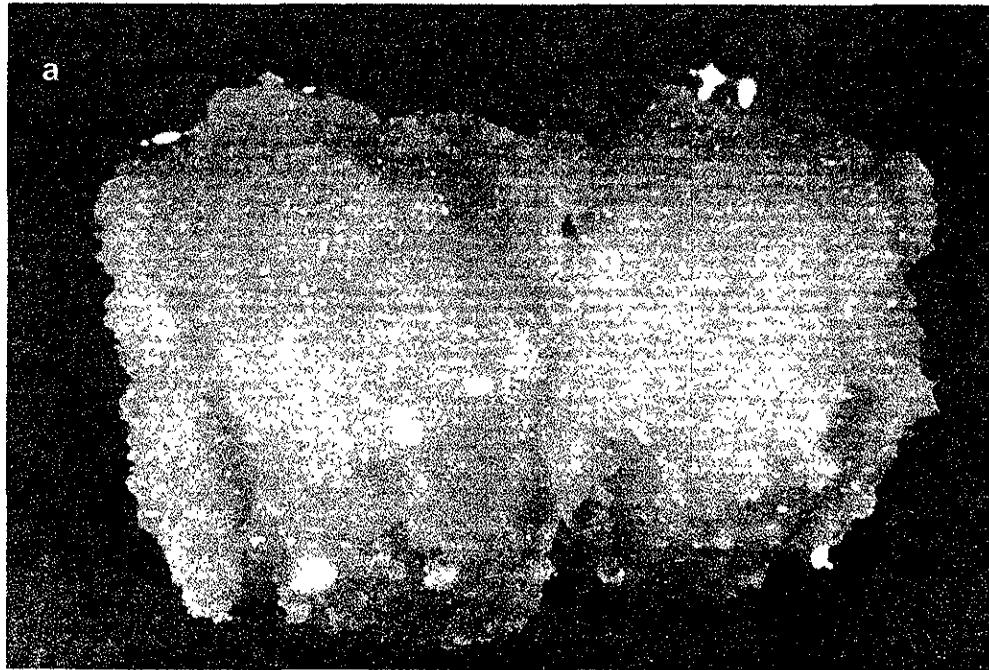
Los primeros cambios obtenidos a partir del cultivo de megagametofitos maduros en el medio Litz adicionado con K y 2,4-D se observaron a los pocos días de cultivo y fueron: las células de la parte basal del explante (distal a la zona arquegonial) se hincharon, principalmente la parte que se encontraba en contacto con el medio; en algunos casos, desde los primeros 20 a 30 días de cultivo en el medio de inducción. Se presentó en dicha zona un crecimiento semejante a callo, en el que se observó el crecimiento de estructuras microscópicas, largas y transparentes sin ningún arreglo en particular (Fig. 2a, b). La mayor proporción de este crecimiento se presentó en los cultivos en oscuridad. Resultados similares se describieron en cultivos de megagametofitos de *Macrozamia communis*, los cuales a la semana de cultivo se hincharon (De Luca *et al.*, 1980). Al término de 60 días de cultivo los callos cambiaron a un color café oscuro, posiblemente por acumulación y oxidación de compuestos fenólicos; algunos presentaron un aspecto deshidratado. No obstante, se continuó con subcultivos mensuales; éstos terminaron por oxidarse completamente hasta considerarlos muertos, toda vez que su aspecto no cambió después de 5 meses.

En los cultivos adicionados con BA y ANA al cabo de 30 días algunos megagametofitos bajo fotoperiodo se encontraron hinchados en su parte basal, solamente el 10% formaron callo aunque también presentaron un color más oscuro que indicó el inicio de oxidación; después de 3 o 4 subcultivos terminaron

oxidándose completamente. En cambio, los cultivos mantenidos en oscuridad mostraron un mayor desarrollo de callo y la oxidación no se presentó al inicio. Sin embargo, después de varios subcultivos la mayoría comenzó a tornarse café oscuro, lo que indicó el comienzo de la oxidación. Solamente en contados casos se presentó un ligero aumento de biomasa, pero finalmente los explantes sufrieron oxidación total.

El crecimiento del callo se obtuvo en combinaciones hormonales muy distintas y no se pudo determinar una tendencia que mostrara qué concentraciones de citocinina-auxina promovería algún desarrollo. No se presentó organogénesis. La formación de callo sin obtener respuestas morfogénicas también se reportó en cultivos de megagametofitos de *Encephalartos* (De Luca y Sabato, 1980).

El subcultivo periódico de los explantes a medio Litz 50% tampoco favoreció el desarrollo, ya que no se observó incremento en masa y la oxidación también fue letal después de varios subcultivos. Resultados similares se presentaron en cultivos haploides de *Ephedra foliata*, en cuyo caso solamente se formó callo que no pudo ser mantenido por mucho tiempo (Sankhla *et al.*, 1967).



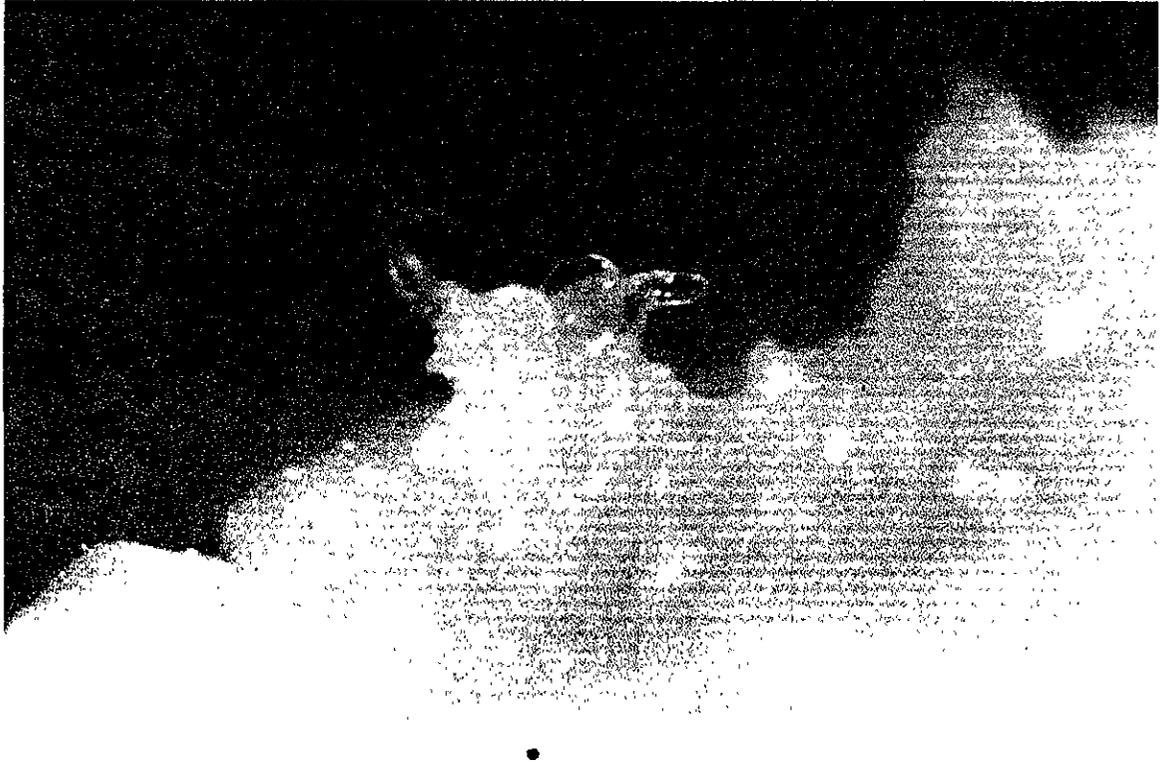
**Figura 2. a)** Formación de callo en la superficie del megagametofito  
**b)** Acercamiento de la formación de células alargadas, transparentes y hialinas.

## Cultivo *in vitro* de megagametofitos inmaduros en medio Litz

Los cultivos a partir de megagametofitos de semillas inmaduras y sembrados en medio Litz en oscuridad, mostraron un rápido crecimiento de callo desde el primer mes de cultivo, sobre todo de aquellos que se encontraban en medio adicionado con K y 2,4-D, que contrastó con el formado a partir de los megagametofitos de semillas maduras. El callo se formó comúnmente en toda la superficie, se observó de aspecto hialino, friable y húmedo, que le dio a los megagametofitos un aspecto rugoso, muchas veces con células o grupos de células cristalinas y alargadas que sobresalían de la superficie (Fig. 3), evocando el inicio de cultivos embriogénicos en otras especies de coníferas y cícadas (Attree y Fowke, 1991). El primer indicio de cambio ocurrió a los 4 o 5 días después de la siembra; se manifestó como el crecimiento de los megagametofitos, los cuales se observaron turgentes; después reventó su superficie, comúnmente en el extremo chalazal, emergiendo células cristalinas alargadas. A los 15 días ya existía un callo que se inició en la parte que estaba en contacto con el medio de cultivo para posteriormente cubrir todo la superficie del megagametofito.

Al cabo de 2 meses de cultivo, aquellos explantes que se trataron inicialmente con altas concentraciones de 2,4-D ( $1-5 \text{ mg l}^{-1}$ ), presentaron el mayor crecimiento de callo. Cultivos de porciones de megagametofitos de *Macrozamia communis* y *Cycas revoluta* cultivados en medio White adicionado de K y 2,4-D también formaron callo después de dos meses, particularmente en la porción que se encontraba en contacto con el medio. Alrededor del cuarto mes de iniciado el cultivo se presentó la emergencia de estructuras con geotropismo negativo que se

cultivo se presentó la emergencia de estructuras con geotropismo negativo que se identificaron como raíces coraloides; el 50% de los explantes desarrollaron dichas raíces (De Luca *et al.*, 1980; De Luca y Sabato, 1980).



**Figura 3.** Células alargadas, transparentes con aspecto húmedo, que asemejan las primeras etapas de embriogénesis en otras Gimnospermas

La formación de callo estuvo asociada a la presencia de la auxina. En los tratamientos adicionados únicamente con kinetina no se generó callo y este fitoregulador al parecer no fue fundamental para el desarrollo de callo. Es sabido que para iniciar el desarrollo de callo y la embriogénesis en cultivos diploides y haploides los reguladores del crecimiento más empleados son las auxinas, sobre todo el 2,4-D (Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993). Sin embargo para obtener respuestas organogénicas se han utilizado preferentemente las citocininas y en algunos casos la combinación de citocininas con auxinas. En promedio los incrementos en crecimiento fueron de alrededor del 50%, en un rango de 10 a 100% de aumento (el tamaño original de los megagametofitos era de 4-5 mm long). No se observaron diferencias entre los tratamientos con las distintas concentraciones de la auxina 2,4-D.

Se obtuvo un ligero incremento en los cultivos transferidos a medio Litz 50% sin reguladores del crecimiento después del periodo de inducción en comparación con aquellos mantenidos en el medio original, en ningún caso se observó la formación de estructuras organizadas.

La oxidación fue el factor que limitó el cultivo de megagametofitos de *P. chihuahuana*. Esta alteración ocurrió al subcultivarlos o con solo mover las estructuras dentro del mismo frasco; sus efectos fueron evidentes aproximadamente a los 10 días del primer subcultivo, en la mayoría de los casos la oxidación fue letal, en otros fue menor e inclusive en algunos cuantos no se presentó. Hubo mayor oxidación en los tratamientos con citocininas y en ausencia de auxinas (2,4-D); esto ocurrió aún desde el periodo de inducción.

Después de 7 meses de continuos subcultivos, la mayoría de los explantes se oxidaron completamente, pocos conservaron un color café claro, el aumento en la biomasa fue nulo.

## **Cultivos de megagametofitos con baños con solución antioxidante**

### **Bajo fotoperiodo**

Los megagametofitos cultivados bajo condiciones de fotoperiodo mostraron un desarrollo muy limitado en todos los tratamientos y sólo en pocos casos se formó un callo superficial, es decir, solamente se desarrolló en la parte superior del explante y éste fue en poca cantidad. La respuesta fue tan errática y escasa que no se pudo establecer una combinación hormonal que favoreciera en mayor medida la formación y desarrollo de callo.

Mediante la aplicación de los baños con la solución antioxidante se pudo controlar o disminuir el efecto de la oxidación, la cual se presentó solamente en algunos casos y los pocos explantes que formaron callo tuvieron un aspecto blanco o hialino y friable, con células largas y transparentes.

### **En oscuridad**

La respuesta generalizada en este caso fue la formación de callo, con una biomasa muy superior a la de los cultivos bajo fotoperiodo, llegando a incrementar su tamaño original (4x2 mm aprox.) de dos a tres veces (Cuadro 2). El aspecto de los callos fue en general húmedo, hialino, con células cristalinas alargadas, generalmente en la parte superior del explante, es decir, la porción más alejada del medio de cultivo, lo cual contrasta con los resultados empleando

megagametofitos maduros y con lo reportado para varias especies de cícadas (De Luca, 1980; De Luca y Sabo, 1980).

Lamentablemente también se presentó la oxidación aunque en un grado menor en comparación a los cultivos que no se les aplicó el baño con antioxidantes.

En el Cuadro 2 se puede observar que no todos los explantes formaron callo; el desarrollo de éste se presentó en casi todas las combinaciones hormonales ensayadas y no se observó claramente un requerimiento de citocininas o auxinas para desarrollar mayor biomasa. Las combinaciones hormonales 1/3, 0.5/2 y 1/1 mg l<sup>-1</sup> de BA/ANA fueron las que generaron mayor volumen de callo. Para el caso de los tratamientos con K/2,4-D la formación de callo se presentó en todos los tratamientos que contenían auxina a excepción del tratamiento con 3 mg l<sup>-1</sup> de K. Solamente en uno de los explantes proveniente del tratamiento con 1 mg l<sup>-1</sup> de BA y 3 mg l<sup>-1</sup> se pudo apreciar la formación de varias estructuras organizadas que se desarrollaron a partir del callo. Su forma era alargada, con células alineadas paralelamente y de un aspecto de hoja. El tamaño alcanzado por esta estructura fue de apenas 1 o 2 mm (Fig. 4). Lamentablemente el callo comenzó a presentar indicios de oxidación, lo que finalmente afectó el desarrollo de esta estructura. En *Ephedra foliata* empleando BA y 2,4-D, se desarrolló callo y se formaron raíces, aunque en menor número que cuando se empleó K en lugar de BA (Singh *et al.*, 1981). Los reportes sobre organogénesis son escasos en relación con los de embriogénesis somática en el género *Picea*; von Aderkas y Dawkins (1993) reportaron la formación de plántulas a partir de

cultivos de megagametofito en *Picea abies*. Para varias cicadas (*Ceratozamia*, *Cycas* y *Zamia*) se ha reportado la formación de brotes y raíces (De Lucas *et al.*, 1980).

**Cuadro 2.** Formación de callo a partir de megagametofitos inmaduros cultivados en medio de inducción 30 días y subcultivado a Litz50%; resultados después de 6 meses de cultivo

Tratamiento (mg l <sup>-1</sup> )	% de explantes con callo	Tamaño de callo mm ± D.S.	
		Largo	Ancho
K/2,4-D			
0/0	0	s/cambio	s/cambio
5/0	0	s/cambio	s/cambio
3/0	60	6.5±1.8	3.6±0.8
1/3	20	6.0±1.0	4.0±0.0
1/2	60	4.8±0.9	2.8±0.4
1/1	90	7.1±0.8	4.3±1.0
1/1	60	5.7±1.1	3.7±0.9
0.5/2	60	5.8±2.5	3.8±1.1
BA/ANA			
0/0	0	s/cambio	s/cambio
5/0	100	4.4±1.0	3.0±0.8
3/0	30	5.0±0.8	2.3±0.5
1/3	70	9.1±4.2	5.6±1.3
1/2	70	3.4±0.7	3.0±0.7
1/1	80	7.5±1.3	4.3±1.2
0.5/2	80	8.6±2.8	5.4±1.4

10 explantes por tratamiento  
D.S.= desviación estándar



**Figura 4.** Desarrollo de estructuras semejantes a hojas a partir de megagametofito inmaduro de *P. chihuahuana* después de 6 meses de cultivo.



**Figura 5.** Células largas y vacuoladas que se desprendieron del megagametofito y continuaron creciendo sobre el medio de cultivo.

En algunos cultivos ( $1/3$  y  $1/2$  mg l<sup>-1</sup> de K/2,4-D) de más de un año y con subcultivos continuos se formaron células largas, hialinas, transparentes y vacuoladas; algunas se desprendieron del tejido e incrementaron su longitud considerablemente en comparación a las células que permanecieron en el explante; éstas se encontraron diseminadas alrededor del callo en contacto con el medio de cultivo (Fig. 5) sin evidencia clara de que proliferarán pues no formaron un callo o alguna estructura organizada.

En cultivos embriogénicos las células pasan por varias etapas. Se ha reportado que la respuesta inicial de los megagametofitos es la elongación de las células cercanas a la superficie del corte o a la cavidad donde se encontraba el embrión (von Aderkas y Dawkins, 1993). Esta fue una respuesta generalizada de los cultivos de megagametofitos de *P. chihuahuana*. Los mismos autores indican que el tejido puede continuar produciendo células alargadas y vacuoladas indefinidamente y que mucho tejido puede morir después de unos cuantos meses posteriores a la inducción, a pesar de transferir los explantes a un medio libre de hormonas u otro tipo de medio.

En el siguiente estado ocurre el desarrollo de una población de células cortas a través de divisiones polares de células largas vacuoladas o por celularización de grandes coenocitos. Estas células pequeñas son capaces de producir células largas y cortas alternadas; esto ha sido reportado para *Picea* y *Larix* (von Aderkas y Dawkins, 1993; Bonga y von Aderkas, 1992). Esta respuesta también se presentó en los cultivos del presente estudio. Cabe recordar que se formaron células largas y vacuoladas que en ocasiones se desprendieron del callo

y continuaron su crecimiento en el medio de cultivo (Fig. 5). Este crecimiento puede continuar por años y no garantiza que se formen embriones; muchos cultivos permanecen en este estado, y solamente unos cuantos logran formar embriones. Se han realizado diversos intentos para alterar el desarrollo modificando la concentración de los componentes del medio y de los reguladores del crecimiento, pero en la mayoría de los casos han fallado, por lo que probablemente las respuestas morfogénicas en estos casos tengan una implicación genética. Esto se demostró en cultivos haploides de *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* y *Picea abies*, en donde el genotipo y el ambiente influyeron en la inducción de los cultivos (von Aderkas y Dawkins, 1993). La condición fisiológica también influye. Por ejemplo, en cultivos de megagametofitos de *Larix decidua* los explantes que se colectaron en la mitad del cono fueron de mayor tamaño y respondieron mejor que los de las secciones superiores e inferiores del cono (von Aderkas y Bonga, 1988). Esto sugiere que la competencia del tejido del megagametofito depende del genotipo, factores ambientales estacionales que afectan la fisiología del árbol y el estado de desarrollo del megagametofito, así como las condiciones ambientales *in vitro* (von Aderkas y Bonga, 1988).

A pesar de que no se logró la formación y desarrollo de estructuras organizadas, los resultados obtenidos indican que los megagametofitos de *P. chihuahuana* poseen cierta capacidad para responder a los estímulos hormonales empleados, con lo que persiste la posibilidad de que en un futuro se puedan explorar distintos medios y hormonas que permitan lograr obtener plántulas

haploides a partir de megagametofitos. Este avance traería como consecuencia poder producir plantas diploides homocigóticas que permitan revelar variaciones crípticas o recesivas que puedan ayudar a mantener o aumentar la variación genética de las poblaciones naturales mediante cruzas controladas, así como el fitomejoramiento de la especie.

### **Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros en medio Litz**

El empleo del medio de cultivo Litz para la inducción de respuestas morfogénicas en embriones inmaduros de *P. chihuahuana* generó en la mayoría de los cultivos en oscuridad un desarrollo de callo a partir de los cotiledones, siendo más evidente en aquellos cultivos en presencia de auxinas ( $1-5 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Fig. 6a). El callo formado tenía un aspecto hialino, húmedo y esponjoso, de color blanco a verde claro; el desarrollo de éste se presentó desde la primera semana de cultivo y al cabo de 30 días el crecimiento fue considerable; el embrión midió 3 mm en promedio y el callo alcanzó  $1 \text{ cm}^3$ , aproximadamente. El hipocótilo en la mayoría de los tratamientos no generó callo, se tornó oscuro y al subcultivar los explantes generalmente se desprendió y no mostró signos de crecimiento posterior.

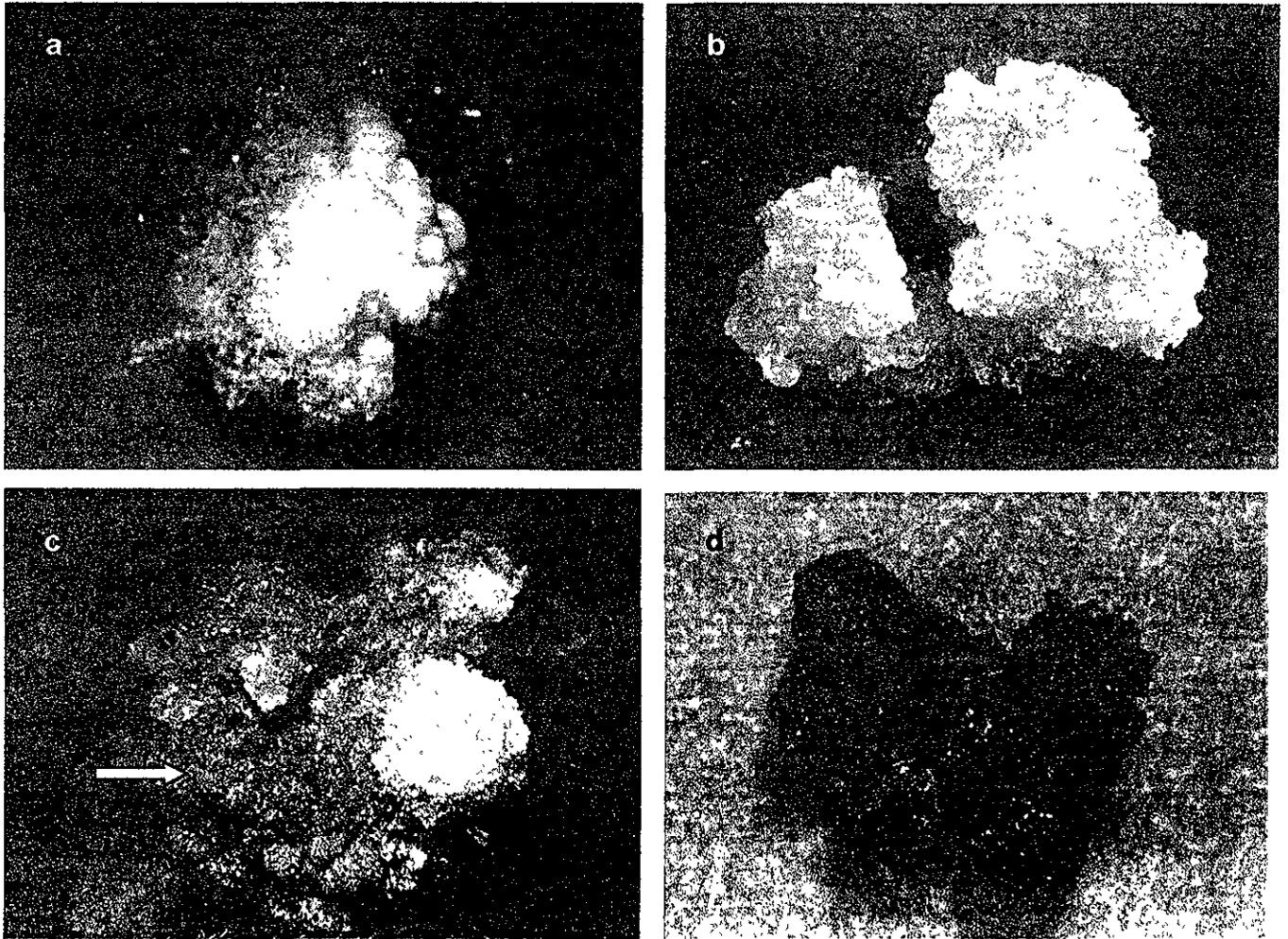
En el caso de los cultivos con citocinina y baja o nula concentración de 2,4-D, los embriones presentaron un hinchamiento y elongación en su totalidad; los cotiledones se alargaron de manera considerable en varios tratamientos (bajas concentraciones de ambas hormonas) y sólo en algunos casos se pudo observar la aparición de pequeños primordios de brotes en la base de los cotiledones.

Para los cultivos bajo fotoperiodo, el resultado fue similar, únicamente varió la coloración del callo, que fue de un tono verde más intenso (Fig 6b).

Al subcultivar los explantes en medio Litz o SH 50% y colocarlos en condiciones ya sea bajo fotoperiodo u oscuridad, se presentó una severa oxidación, ocasionando una considerable pérdida del material (Fig 6c y d). Sólo algunos explantes, particularmente los provenientes de los tratamientos con altas concentraciones de auxinas, mostraron después de 30 días la reanudación de su crecimiento. En cultivos de embriones cigóticos de *Pinus banksiana* a las 12 semanas se presentó una extensa oxidación a pesar de adicionar al medio de cultivo ácido ascórbico, carbón activado y polivinilpirrolidona. (Harry y Thorpe, 1994),

Para el caso de los explantes en oscuridad, se desarrolló un callo de color blanco y para los explantes en luz se presentó la misma respuesta, con la diferencia de que el callo nuevo fue de color verde; el efecto de la oxidación en estos casos no fue letal. Este proceso fue repetitivo, es decir, el nuevo crecimiento después de varios subcultivos se volvió a oxidar y en cultivos de 7 meses se volvió a presentar una nueva formación de callo, sin que se haya observado la formación de estructuras organizadas.

El desarrollo de callo se pudo deber al alto contenido de compuestos orgánicos del medio, este tipo de compuestos nitrogenados en otras especies ha promovido la formación de embriogénesis somática, lo que en el presente trabajo no ocurrió.



**Figura 6.** a) Embrión inmaduro de *P. chihuahuana* cultivado en medio Litz en oscuridad a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , donde se puede apreciar la formación de callo en la base de los cotiledones, b) Embrión inmaduro cultivado en medio Litz bajo fotoperiodo 16 h, fotoperiodo 16 h,  $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  y  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , donde la formación de callo se presentó en toda la superficie de los cotiledones, c) inicio de la oxidación (flecha) en el callo generado a partir de embriones inmaduros, d) Oxidación total del explante después de 90 días de iniciado el cultivo.

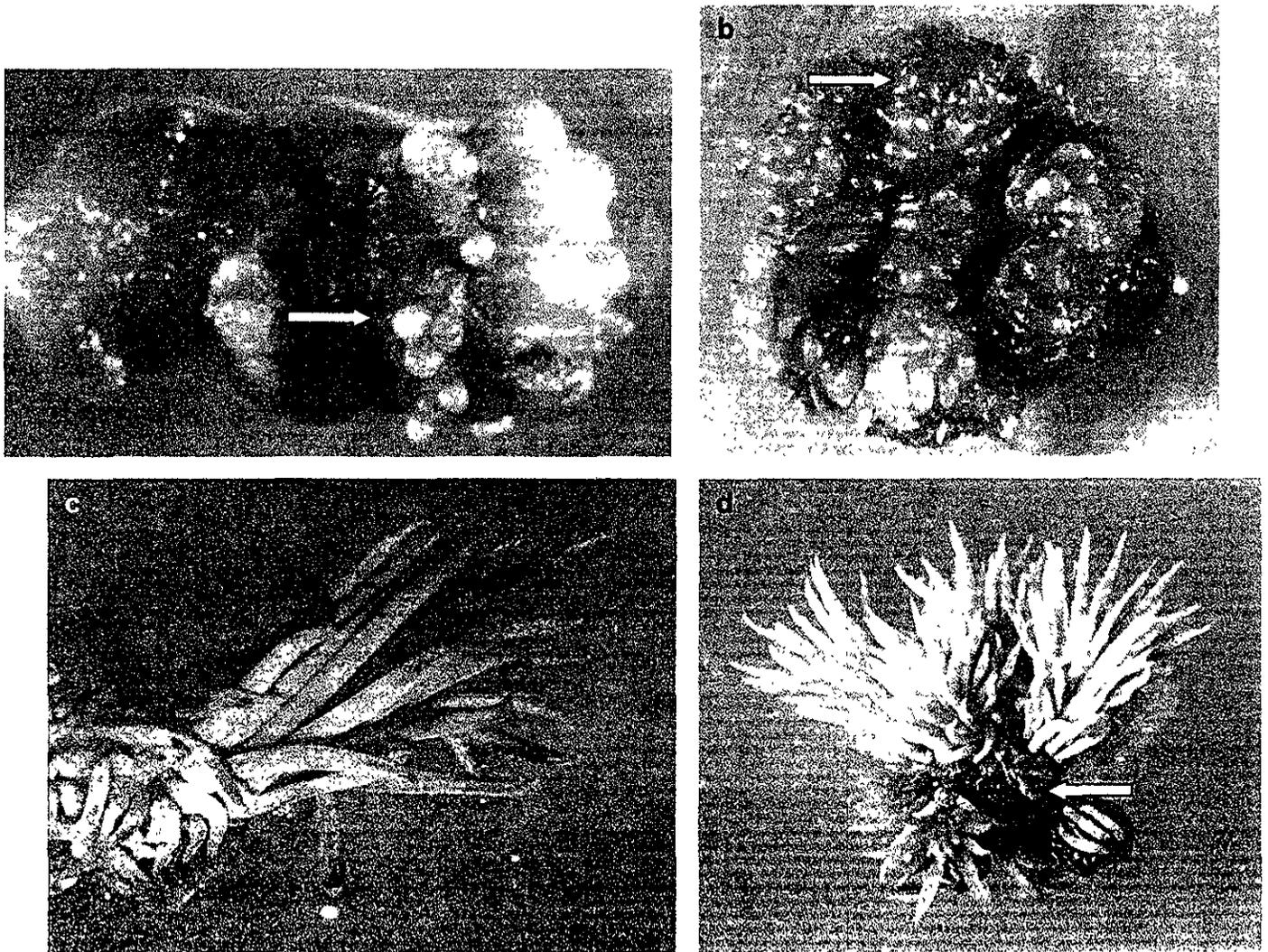
## **Cultivo de embriones en medio SH**

Los cultivos de embriones sembrados en medio de inducción SH bajo fotoperiodo mostraron desde el primer mes un mejor desarrollo que los cultivados en medio Litz. A los 30 días ya mostraban cotiledones hinchados con su superficie de aspecto rugoso por la presencia de numerosas protuberancias que posteriormente se consolidaron en primordios de brotes (Fig. 7a). Villalobos *et al.* (1985) indican que la apariencia nodular de los cotiledones bajo la influencia de hormonas se debe al incremento de tamaño y diferenciación de meristemoides originados por debajo de la epidermis. El hipocótilo generalmente no presentó un crecimiento ni cambios notables; al cabo de 30 días se tornó de color oscuro; en la mayoría de los explantes permaneció unido y solamente en algunos casos se desprendió de los cotiledones. En ningún caso se registró la emergencia y desarrollo de la raíz de los embriones.

Al igual que en otras coníferas, el desarrollo de los brotes adventicios fue estimulado por la dilución del medio de cultivo a la mitad de sus componentes (von Arnold y Eriksson, 1981; Thorpe y Harry, 1991; Harry *et al.*, 1995). Al subcultivar los explantes a medio SH 50% las protuberancias vistas bajo el microscopio presentaron una forma piramidal compuesta de varias estructuras que estaban divididas por la marca de ligeros surcos. Al término de 30 días las pequeñas protuberancias se diferenciaron y se reconocieron como brotes adventicios en los cuales se podían observar claramente el meristemo (domo) y los primordios de hoja (Fig. 7b). Generalmente los brotes se desarrollaron a lo largo de los cotiledones; en algunos casos la mayor cantidad se formó en la base de los

cotiledones y solamente unos cuantos se formaron a partir del hipocótilo. Se han observado respuestas similares en cultivos de embriones de *Pinus contorta* (von Arnold y Eriksson, 1981; Patel y Thorpe, 1984), *P. ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989). La oxidación que se presentó en los explantes cultivados en medio SH fue controlada mediante la aplicación de baños con solución antioxidante en cada subcultivo, así como por la adición de ésta solución en el medio de desarrollo. En la mayoría de los casos detuvo o disminuyó la oxidación de los tejidos, lo que permitió que los nuevos brotes una vez que alcanzaron 5 a 10 mm de altura se pudieran individualizar. Esto ocurrió a los 3 o 4 meses de iniciados los cultivos. La organización general de los brotes adventicios era el de una zona mersitemática en el centro rodeada de los primordios de hojas con bordes aserrados, de un color verde cenizo (Fig. 7c).

Al parecer, la supervivencia de los brotes estuvo asociada a su talla, pues los brotes mayores de 10 mm generalmente continuaron con su desarrollo, en tanto que los de menor tamaño, en algunos casos, no se desarrollaron y terminaron necrosados o reabsorbidos por los otros (Fig. 7d). Resultados similares se han reportado para cultivos de *Cupressus sempervirens* (Capuana y Giannini, 1997). García-Ferriz *et al.* (1994) mencionan que en el cultivo de embriones cigóticos de *Pinus pinea* no todos los primordios de brotes que inicialmente se formaron en el periodo de inducción lograron desarrollarse en brotes.



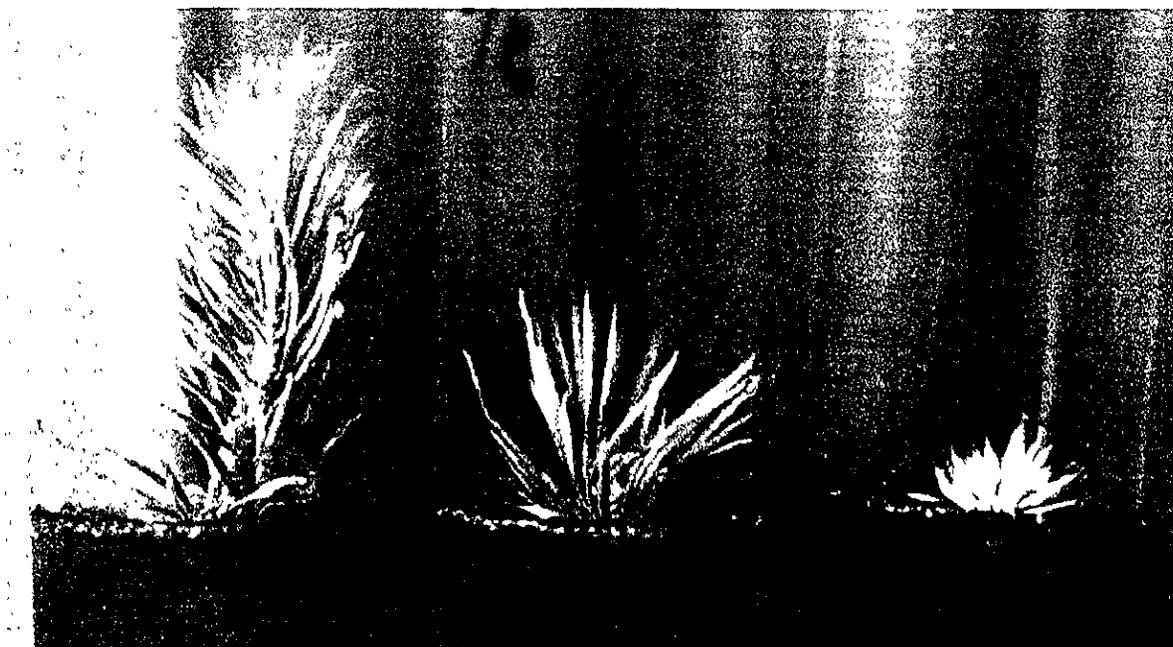
**Figura 7.** a) Embrión inmaduro de *P. chihuahuana* después de 30 días de cultivo en medio SH + 5 mg l<sup>-1</sup> de K. Se observan las protuberancias que darán lugar a brotes adventicios; b) Desarrollo inicial de brotes adventicios; se observa el domo del meristemo rodeado de los primordios de hojas; c) Brote adventicio de mayor tamaño (2 meses de cultivo) que muestra el borde aserrado de sus hojas; d) Aspecto de brotes adventicios después de 4 meses de iniciado el cultivo; se aprecia el mayor desarrollo de unos brotes en comparación de otros en los cuales inclusive se aprecia indicio de oxidación (flecha).

La formación de primordios de brotes en las primeras etapas de desarrollo fue numerosa y asincrónica, lo que hizo difícil su conteo, por lo que los resultados que se presentan son de brotes que alcanzaron una talla de por lo menos de tres milímetros, que en general eran los que llegaban a consolidarse como nuevos brotes. Los resultados se muestran en el Cuadro 3; se puede observar que en casi todas los tratamientos (BA/ANA, K/2,4-D) se presentó la formación de nuevos brotes, siendo mayor en la combinación K/2,4-D y en particular con 1/2 mg l<sup>-1</sup> de K/ 2,4-D, donde el 100% de los explantes mostraron algún tipo de respuesta, con el mayor número de brotes por embrión (6.5), seguidos por las combinaciones 1/3 y 3/0 mg l<sup>-1</sup> con 6 y 5 brotes por embrión respectivamente. En el caso de los tratamientos con BA/ANA, la mayor formación de brotes ocurrió también en las concentraciones 1/2 y 3/0 mg l<sup>-1</sup>, con 5 y 3.7 embriones por embrión respectivamente.

La altura alcanzada por los brotes individualizados varió de 5 a 25 mm. Estas alturas se lograron después de 6 meses de subcultivos periódicos (Fig. 8). Es posible que las diferencias se puedan deber a que en los grupos de brotes múltiples al menos un brote parece ejercer una dominancia sobre el resto, pues al individualizar los brotes de mayor talla el resto se desarrolló a una velocidad mayor, pero en algunos caso, los brotes más pequeños y aquellos que se encontraban cerca de la zona de corte se oxidaron y terminaron necrosados. Si bien con K/2,4-D se formó la mayor cantidad de brotes, aquellos inducidos con BA/ANA alcanzaron una mayor altura que los tratados con K/2,4-D (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Formación de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros de *P. chihuahuana*, inducción de 30 días en SH y subcultivos a SH 50% ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ). Resultados al término de 6 meses de iniciados los cultivos.

Tratamientos K/2,4-D ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Número de explantes	Número de explantes con brotes	Número total de brotes	Prom. Brotes por embrión	Altura brotes (mm) $\pm$ D.S.
0/0	5	2/5	2	1.0	20.0 $\pm$ 10.0
5/0	5	2/5	7	3.5	3.9 $\pm$ 0.99
3/0	5	3/5	15	5.0	7.2 $\pm$ 6.63
1/1	5	2/5	0	0.0	0.0
1/2	5	5/5	26	6.5	7.0 $\pm$ 4.50
1/3	5	3/5	18	6.0	5.6 $\pm$ 4.49
0.5/2	5	0/5	0	0.0	0.0
<b>BA/ANA (<math>\text{mg l}^{-1}</math>)</b>					
0/0	5	2/5	2	1.0	20.0 $\pm$ 10.0
5/0	5	2/5	4	2.0	9.5 $\pm$ 6.87
3/0	5	3/5	11	3.7	2.9 $\pm$ 1.67
1/1	5	2/5	3	1.5	10.3 $\pm$ 0.47
1/2	5	2/5	10	5.0	11.4 $\pm$ 9.18
1/3	5	0/5	0	0.0	0.0
0.5/2	5	2/5	2	1.0	16.0 $\pm$ 2.0



**Figura 8.** Desarrollo de brotes adventicios individualizados después de 6 meses de iniciado el cultivo. La altura alcanzada por los brotes fue de 5 a 25 mm.

Muchos de los reportes bibliográficos sobre morfogénesis en cultivos *in vitro* de Gimnospermas señalan que la combinación de altas concentraciones de BA y bajas o nulas de auxinas han resultado ser los tratamientos más efectivos para promover el desarrollo de brotes adventicios en cultivos de embriones cigóticos (von Arnold y Eriksson, 1981; Villalobos *et al.*, 1985; Ellis y Bilderback, 1989; Harry *et al.*, 1995; Capuana y Giannini, 1997). A pesar de que la bencil aminopurina es la citocinina más efectiva para la inducción de brotes adventicios en coníferas (Thorpe y Harry, 1991) ésto no ocurrió en el presente trabajo ya que los tratamientos con K/2,4-D (Cuadro 3) generaron los mejores resultados; ésto coincide con reportes sobre *P. abies* en los que la kinetina promovió el mayor número y desarrollo de brotes (von Arnold, 1982 citado por Kolevska-Pletikapié y Buturovic-Deric, 1995). De igual manera, los mejores resultados al cultivar embriones maduros de *P. chihuahuana* se lograron empleando kinetina (López, 1996, comunicación personal).

Con base en los resultados obtenidos en el primer experimento empleando el medio SH se decidió realizar otro ensayo bajo las mismas condiciones para corroborar lo obtenido, ya que de los 5 explantes iniciales en cada tratamiento no todos respondieron a la formación de brotes adventicios. Esto pudo deberse a diversos factores, entre otros, a que al momento de la disección se pudo dañar al embrión; a la falta de viabilidad de la semilla; que los embriones no hubieran alcanzado un estado fisiológico de competencia. Por estas razones los resultados obtenidos hasta esta fase se tomaron con cierta reserva. En el cultivo de embriones de *Juniperus cedrus*, Harry *et al.* (1995) encontraron variación en la

formación de brotes adventicios de 2 a 10 por explante, atribuyendo esta respuesta a la variación genética de la especie.

Los resultados de este nuevo ensayo se muestran en el Cuadro 4. Al aplicar el análisis de varianza para los dos juegos hormonales empleados y el control (0/0), se pudo establecer que existe diferencia significativa ya que la probabilidad de p obtenida fue de 0.000241. Con la prueba de Tukey (cuadro 5) se pudo establecer que los tratamientos adicionados con BA/ANA no son diferentes significativamente al control, pero este último si lo es con respecto a los tratamientos con K/2,4-D. A pesar de que no se encontró diferencia entre los dos juegos hormonales, se puede observar que después de seis meses de cultivo, el mejor desarrollo y la mayor formación de brotes se dio en los tratamientos con la combinación hormonal K/2,4-D.

El análisis de varianza aplicado únicamente a los tratamientos con K/2,4-D indicó que si existe diferencia significativa ya que la p fue igual a 0.00522. La prueba de Tukey aplicada (Cuadro 6) estableció que los embriones cigóticos cultivados con  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de K, en lo que respecta a la formación de brotes, son estadísticamente diferentes a los tratamientos con 0.5/2, 1/1 y  $1/3 \text{ mg l}^{-1}$ , pero no diferentes a los tratamientos con 5/0, 2/1 y  $1/2 \text{ mg l}^{-1}$ . Por lo que se consideró que los mejores tratamientos al igual que en el primer experimento fueron el 3/0, 5/0, 2/1 y  $1/2 \text{ mg l}^{-1}$  con 7.2, 6.4, 5.8 y 4.6 brotes por embrión respectivamente. En el primer experimento la mayor formación de brotes se obtuvo con la combinación 1/2 de K/2,4-D, es importante mencionar que fue el único tratamiento en donde todos los embriones respondieron. En el segundo ensayo la mayoría de los

embriones respondieron al medio de cultivo y a las combinaciones hormonales de los diferentes tratamientos, motivo por el que se podría considerar de mayor exactitud, los resultados obtenidos presentaron algunas diferencias con el primer experimento, pero cabe resaltar que los cuatro mejores tratamientos se mantuvieron en ambos ensayos.

Estos resultados indican que el desarrollo de brotes a partir de los embriones inmaduros se puede dar en los dos juegos de reguladores del crecimiento ensayados y en un rango amplio de sus concentraciones hormonales, siendo las combinaciones de K/2,4-D las que mejor estimularon la formación de brotes adventicios, en donde las citocininas tienen que estar presentes preferentemente en altas concentraciones con nulas o bajas concentraciones de auxinas.

**Cuadro 4.** Respuestas de embriones inmaduros de *Picea chihuahuana* en medio SH adicionado con diferentes concentraciones de citocininas/auxinas durante un mes y subcultivados a medio SH 50%. Resultados al término de seis meses de iniciados los cultivos ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tratamiento K/2,4-D ( $\text{mg l}^{-1}$ )	No de explantos	No. de explantes con brotes	No. total de brotes	Promedio de brotes por embrión $\pm$ D.S.
0/0	10	2/10	2	$0.2 \pm 0.4$
3/0	6	1/1	43	$7.2 \pm 2.7$
5/0	6	5/6	32	$5.3 \pm 3.3$
2/1	6	5/6	29	$4.8 \pm 3.1$
1/2	6	5/6	25	$4.2 \pm 2.9$
1/3	5	4/5	15	$2.5 \pm 1.6$
1/1	6	5/6	12	$2.0 \pm 1.4$
0.5/2	6	5/6	8	$1.6 \pm 1.1$
<b>BA/ANA</b>				
3/0	6	6/6	33	$5.5 \pm 2.2$
5/0	6	6/6	29	$4.8 \pm 1.6$
2/1	6	3/6	13	$2.2 \pm 2.6$
1/3	6	5/6	13	$2.2 \pm 1.3$
1/2	6	3/6	12	$2.0 \pm 2.4$
1/1	6	3/6	10	$1.7 \pm 1.9$
0.5/2	5	2/5	4	$0.8 \pm 1.1$

**Cuadro 5.** Discriminación para el número de brotes adventicios formados entre los juegos hormonales empleados.

Tratamiento	n	Promedio de brotes por tratamiento $\pm$ D.S.
Control	10	$0.2 \pm 0.4$ a
BA/ANA	41	$2.8 \pm 2.4$ a b
K/2,4-D	41	$4.0 \pm 2.9$ b

**Cuadro 6.** Formación de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* en medio de inducción SH adicionado con K y 2,4-D durante un mes y subcultivado a medio SH 50%. Resultados al término de seis meses de iniciados los cultivos. ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tratamiento K/2,4-D	Promedio de brotes por embrión $\pm$ D.S.
0.5/2	$1.6 \pm 1.1$ a
1/1	$2.0 \pm 1.4$ a
1/3	$2.5 \pm 1.6$ a
1/2	$4.2 \pm 2.9$ a b
2/1	$4.8 \pm 3.1$ a b
5/0	$5.3 \pm 3.3$ a b
3/0	$7.2 \pm 2.7$ b

### Desarrollo de brotes

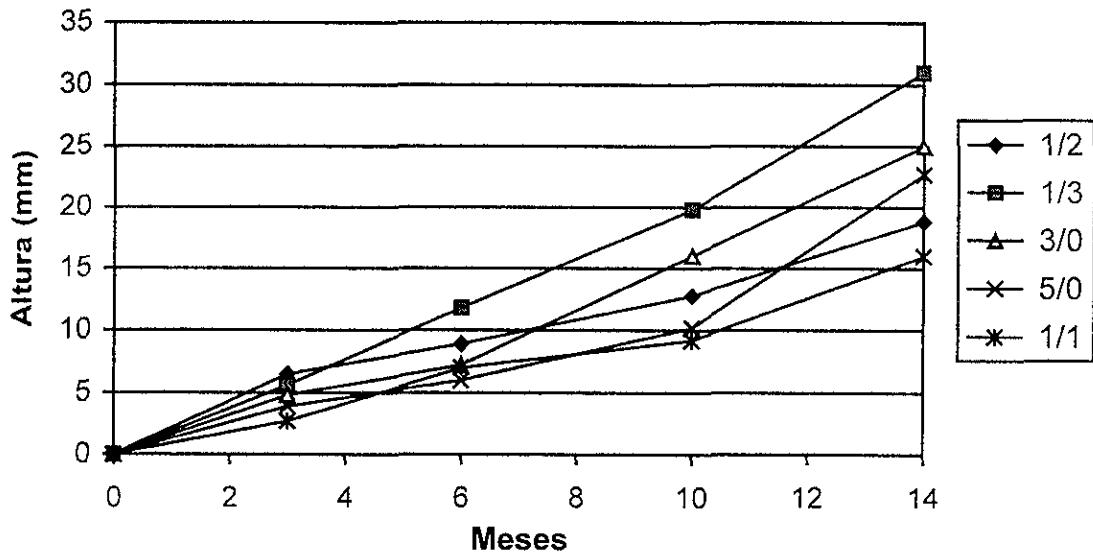
Los brotes obtenidos empleando el medio SH continuaron su desarrollo, aunque en algunos casos unos cuantos brotes perdieron su coloración verde y adquirieron una amarillenta, otros se oxidaron y finalmente terminaron muriendo. Para el caso de los que continuaron con su crecimiento, el incremento en su longitud fue considerable después de 14 meses de subcultivos periódicos. En el Cuadro 7 y en las Gráficas 1 y 2 se puede observar que el crecimiento tuvo una tendencia lineal. En general los brotes provenientes de los cultivos en SH inducidos con la combinación hormonal de K/2,4-D alcanzaron una talla mayor, el incremento promedio de la altura de los brotes según las pendientes obtenida al ajustar las diferentes curvas fue de 1.1 a 2.2 mm por cada mes de cultivo (cuadro 7). Los brotes inducidos con BA/ANA mostraron en general un crecimiento menor, el incremento de su altura mensual fue de 0.66 a 1.9 mm. Los brotes con mayor altura se formaron en la combinación K/2,4-D  $1/3 \text{ mg l}^{-1}$  en donde se obtuvo la

pendiente más alta (2.19), seguido de los brotes de 3/0 mg l<sup>-1</sup>, aunque en la combinación 5/0 fue donde se desarrolló el brote de mayor talla (4.5 cm).

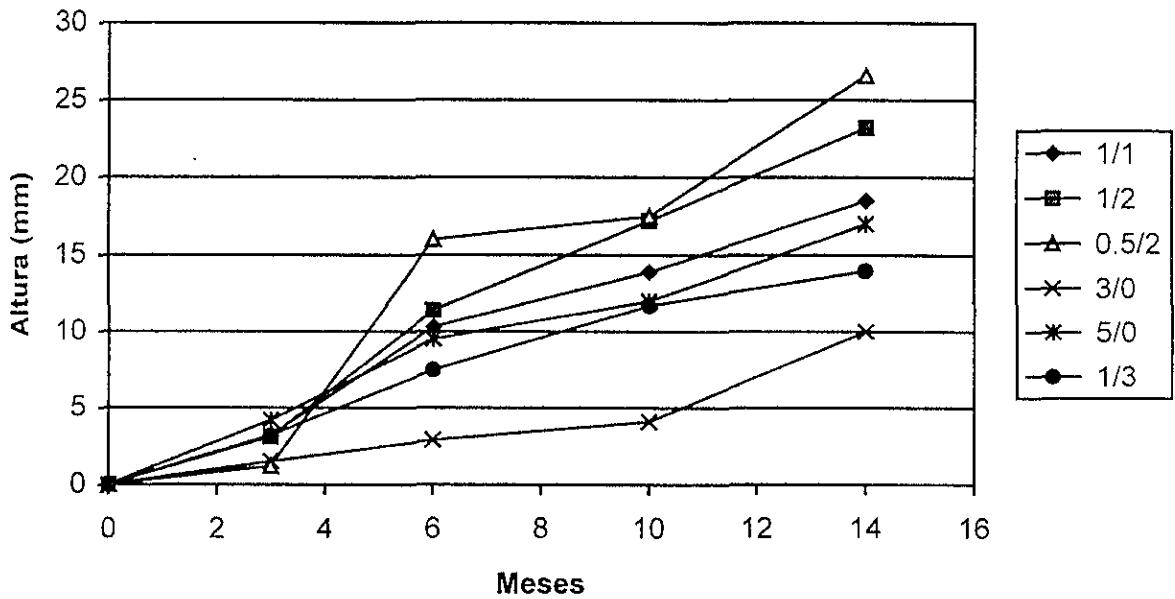
Al parecer el crecimiento de los brotes ocurre de manera semejante al de las ramas de las plantas en el campo, es decir, el crecimiento se da por la formación de una yema vegetativa en el ápice superior de la planta que después de un tiempo germina y se presenta la formación y alargamiento de nuevas hojas. El aspecto de las yemas es muy parecido al de las ramas, presentan numerosas escamas de tejido lignificado. La única diferencia que se presenta es que en las ramas de plantas adultas se forman tres yemas vegetativas, pero al realizar comparaciones con semillas germinadas en invernadero el primer crecimiento se dio mediante la formación de una sola yema vegetativa, después de 2 años de edad las plantas de 6 cm de altura comenzaron a presentar las tres yemas características de la especie, con lo que se podría esperar que al crecer un poco más los brotes puedan formar las tres yemas vegetativas y que llegue a ocurrir el desarrollo de ramas laterales.

**Cuadro 7.** Promedio de altura de los brotes adventicios de *P. chihuahuana* individualizados, medición durante 14 meses de subcultivos mensuales en medio SH 50%. Se muestra la ecuación de la regresión lineal de cada tratamiento.

Tratamiento K/2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	3 meses	6 meses	10 meses	14 meses	Ajuste de la recta
1/2	6.5±4.5	8.9±6.2	12.8±5.7	18.8±4.0	y=1.25X+1.15
1/3	5.6±4.3	11.8±9.6	19.8±10.5	31.0±2.0	y=2.19X+(-0.8)
3/0	4.8±3.7	7.2±6.6	16.0±3.0	25.0±0.0	y=1.77X+(-1.07)
5/0	3.9±2.1	6.0±5.2	10.2±7.1	22.7±14.5	y=1.5X+(-1.35)
1/1	2.7±1.9	7.0±4.5	9.2±3.6	16.0±0.0	y=1.1X+(-0.3)
<b>BA/ANA (mg l<sup>-1</sup>)</b>					
1/1	3.2±3.0	10.3±0.5	13.9±3.8	18.5±0.5	y=1.35X+0.26
1/2	3.1±1.6	11.4±9.2	17.2±8.7	23.2±8.8	y=1.72X+(-0.38)
0.5/2	1.2±0.8	16.0±8.0	17.5±7.5	26.0±0.0	y=1.93X+(-0.61)
3/0	1.5±1.0	2.9±1.67	4.1±1.3	10.0±3.0	y=0.66X+(-0.63)
5/0	4.2±3.1	9.5±6.8	12.0±0.0	17.0±0.0	y=1.18X+0.73
1/3	3.2±2.7	7.5±5.4	11.7±6.3	14.0±2.0	y=1.03X+0.46



**Gráfica 1.** Curva de crecimiento de brotes de *P. chihuahuana* obtenidos *in vitro*. Comparación de varios tratamientos con K/2,4-D



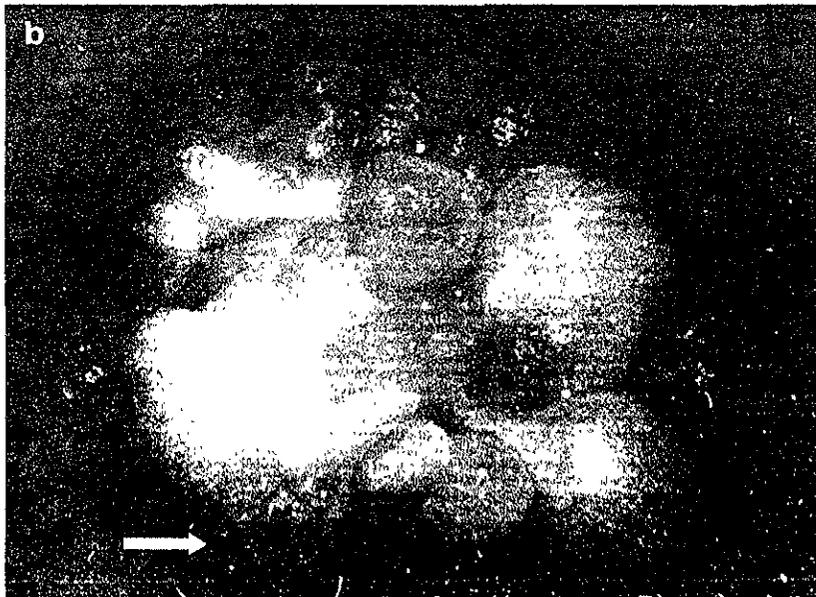
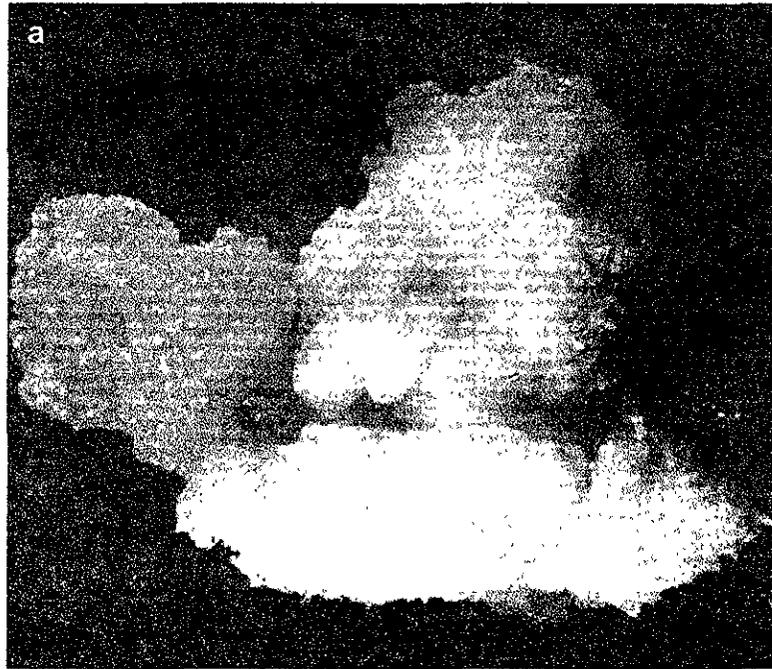
**Gráfica 2.** Curva de crecimiento de brotes de *P. chihuahuana* obtenidos *in vitro*. Comparación de varios tratamientos con BA/ANA

## Cultivo de embriones en oscuridad

La mayoría de los embriones cultivados en oscuridad formaron callo (Cuadro 8, Fig. 9a); después de 6 meses de subcultivos periódicos, la mayoría no generaron respuestas morfogénicas, únicamente incrementaron su biomasa considerablemente (los embriones midieron aproximadamente 3 mm de largo por 1 mm de ancho) hasta cinco veces su tamaño, como los tratados con BA/ANA 1/3 mg l<sup>-1</sup>. Sólo en algunos casos se formaron brotes adventicios (Fig. 9b).

A pesar de que se les aplicaron los baños con la solución antioxidante, la oxidación se presentó en la mayoría de los cultivos, aunque no de manera muy severa pero sí persistente. Los callos presentaron una coloración café clara oscureciéndose hacia la parte del explante que se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Solamente en algunos cultivos se presentó la formación de brotes (Cuadro 8), éstos fueron de menor tamaño que los obtenidos bajo condiciones de fotoperiodo; presentaron una coloración verde muy tenue, su aspecto en general fue débil y generalmente con callo en el embrión.

Para tratar de mejorar el desarrollo de los brotes, uno o dos explantes de los tratamientos BA/ANA 5/0, 1/2 y 1/1 (mg l<sup>-1</sup>) y K/2,4-D 5/0 y 0.5/2 (mg l<sup>-1</sup>) se colocaron bajo fotoperiodo de 16 h, con una densidad de flujo fotónico de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y a 26±2°C. La respuesta después de dos meses bajo dichas condiciones fue la oxidación completa de todos los explantes.



**Figura 9.** a) Embrión inmaduro de *P. chihuahuana* cultivado en oscuridad a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , donde únicamente se formó callo, b) En pocos explantes cultivados en oscuridad en SH +  $5\text{ mg l}^{-1}$  se obtuvo la formación de brotes adventicios (flecha).

**Cuadro 8.** Respuestas obtenidas en los cultivos *in vitro* de embriones inmaduros en medio SH bajo condiciones de oscuridad,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  al término de 6 meses de cultivo.

Tratam mg l <sup>-1</sup>	Explant c/respuesta	Respuesta	No. de brotes	Brot embrión	Long prom. (mm)	Tamaño del callo (mm) ± D.S.	
						Largo	Ancho
<b>K/2,4-D</b>						contaminado	
5/0	4/5	brotes	10	2.5	5.5±2.4		
3/0						7.0±2.1	5.5±2.7
1/3	4/5	callo				6.5±2.5	6.0±3.0
1/1	2/5	callo				7.8±3.0	6.8±3.4
1/2	5/5	callo					
0.5/2	3/5	brotes/callo	1	0.33	7.0±0.0		
<b>BA/ANA</b>							
5/0	2/5	callo				9.0±0.0	7.5±0.5
3/0	3/5	callo				7.3±0.9	6.0±0.8
1/3	2/5	callo				15.0±5.0	9.5±0.5
1/2	3/5	brotes/callo	1	0.33	9.0±0.0		
1/1	4/5	brotes	9	2.2	4.8±2.5		
0.5/2	3/5	callo				9.0±0.8	9.0±0.8

D.S. = desviación estándar

### Cultivo de embriones inmaduros a 29°C

La respuesta de embriones inmaduros a 29°C después de 3 meses de cultivo fue: presentaron sus cotiledones hinchados con la superficie rugosa por la presencia de pequeños nódulos, semejantes a los de los cultivos realizados en el mismo medio (SH) en el experimento inicial a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Solamente que esta respuesta (con menor intensidad luminosa y menor temperatura) se presentó al mes de iniciados los cultivos. Los nódulos formaron primordios de brotes que posteriormente se desarrollaron en brotes. Entre los mejores tratamientos se pueden considerar: K/2,4-D, 1/3 mg l<sup>-1</sup> (Cuadro 9), donde se formaron en promedio 7 brotes por embrión; BA/ANA 5/0 mg l<sup>-1</sup> donde un embrión formó 13 brotes.

En general, se puede decir que la respuesta fue pobre y el desarrollo fue más lento que en los cultivos que se incubaron a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ya que en éstos a los 3 meses ya se habían desarrollado brotes. Al realizar el cuarto subcultivo se pudo observar que el crecimiento de los primordios de brotes fue casi nulo y la oxidación fue severa para la mayoría de los embriones, a pesar que se les dio en cada subcultivo un baño con la solución antioxidante.

**Cuadro 9.** Respuesta obtenida en cultivos *in vitro* de embriones inmaduros de *Picea chihuahuana* cultivados en medio SH después de 3 meses de cultivo ( $29^{\circ}\text{C}$  fotoperiodo 16 h,  $160\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ )

Tratam ( $\text{mg l}^{-1}$ ) 30 días	Explantos c/respuesta	Respuesta de los explantes	No. de brotes	Brotes/ embrión	Long promedio (mm) $\pm$ D S.
<b>K/2,4-D</b>					
0/0	0/5	oxidados			
5/0	3/5	cotiledones hinchados			
3/0	4/5	cotiledones con protuberancias			
1/1	3/5	cotiledones con protuberancias			
1/2	2/5	cotiledones con protuberancias			
1/3	2/5	brotes y cotiledones hinchados	14	7.0	$2.2 \pm 0.9$
0.5/2	5/5	cotiledones hinchados			
<b>BA/ANA</b>					
0/0	0/5	embriones oxidados			
5/0	1/5	brotes y nódulos	13	13.0	$3.2 \pm 1.4$
3/0	3/5	cotiledones hinchados			
1/1	3/5	cotiledones hinchados			
1/2	4/5	cotiledones hinchados			
1/3	1/5	brotes	2	2.0	$2.0 \pm 0.0$
0.5/2	2/5	brotes	5	2.5	$3.7 \pm 2.4$

Las respuestas que se obtienen de los explantes cultivados *in vitro* dependen de múltiples factores, entre ellos, la composición química del medio nutritivo, así como de las condiciones físicas de cultivo. Para varias especies de

pinos se ha logrado incrementar la formación de brotes al cultivarlos a una mayor temperatura y a una densidad de flujo fotónico de  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Sánchez, comunicación personal). Al parecer, *P. chihuahuana* ha mostrado ser difícil de propagar mediante cultivo de tejidos, se necesita un control muy preciso para que los brotes continúen su crecimiento. Con este experimento se pudo demostrar que el incremento en la temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 3) a  $29^{\circ}\text{C}$  y la intensidad luminosa de 50 a  $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tuvo un efecto negativo, ocasionando que el desarrollo de los brotes fuera más lento y que la mortandad de los explantes fuera cercana al 100 % después de cuatro meses. A pesar que se ha tenido éxito con especies de pinos bajo esas condiciones, *P. chihuahuana* ha mostrado ser una especie poco tolerante que necesita de condiciones físicas muy particulares para su desarrollo bajo condiciones *in vitro*, esto se podría esperar ya que en condiciones naturales también muestra un hábitat muy específico para su desarrollo, motivo por el cual ha sido muy difícil su cultivo *in vitro*.

#### **Discriminación entre los mejores tratamientos de K/2,4-D de los cultivos en medio SH**

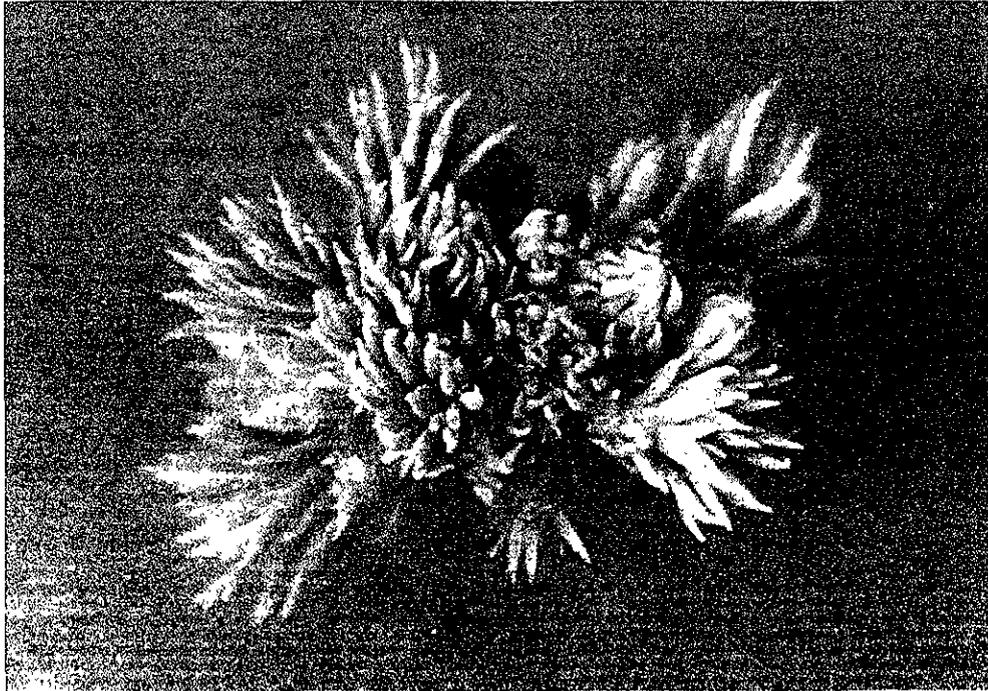
En el Cuadro 10 se reporta el número de brotes formados por embrión y por tratamiento después de cuatro meses de iniciado el experimento.

**Cuadro 10.** Formación de brotes adventicios en embriones inmaduros de *Picea chihuahuana* por inducción de 30 días en medio SH con K/2,4-D y subcultivados a medio SH 50% ( $26\pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Resultados al término de cuatro meses.

K/2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	Número de explantes	Núm. total de brotes	Prom. brotes por embrión
2/1	30	205	6.83 ± 5.17 a
3/0	30	262	8.73 ± 6.14 a b
1/2	30	282	9.40 ± 5.98 a b
5/0	30	337	11.23 ± 5.07 b

Letras diferentes indican diferencia significativa a  $p \leq 0.05$

Al realizar el análisis de varianza se pudo establecer una  $p=0.0279$  por lo que se pudo establecer que existe diferencia significativa entre los tratamientos. Mediante la prueba de rango múltiple de Tukey se pudo establecer únicamente una diferencia significativa entre el tratamiento 2/1 y el 5/0 (Cuadro 10), ya que entre los demás tratamientos no se puede establecer diferencia bajo la prueba estadística aplicada, pero al analizar el Cuadro 10 se observó que el tratamiento con kinetina  $5 \text{ mg l}^{-1}$  es el que presenta el mayor promedio de brotes adventicios formados (11.23) y el mayor número de brotes formados en los 30 embriones analizados (337), con estos datos se puede argumentar que este último tratamiento fue el que ofreció mejores condiciones para la formación de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* (Fig. 10). En *P. omorika* al utilizar citocininas en concentraciones de  $5 \text{ mg l}^{-1}$  también se indujo la formación de un gran número de brotes, pero el desarrollo se vió afectado por la formación de callo. En otras especies de *Picea* la mejor concentración para el desarrollo de brotes adventicios ha sido  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de citocinina (Budimir y Vujcic, 1992).



**Figura 10.** Desarrollo de brotes adventicios generados a partir de embrión cigótico inmaduro de *P. chihuahuana* en medio de inducción SH + 5 mg l<sup>-1</sup> y subcultivado a SH10, después de cuatro meses de cultivo.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## Inducción de raíces

Los brotes adventicios obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de *P. chihuahuana* no generaron raíces de manera espontánea. Esto es un patrón que generalmente se presenta en el cultivo de la mayoría de las Gimnospermas. Son pocos los trabajos que lo reportan, por ejemplo, para *P. abies* se reporta un 5% (von Arnold, 1982) y un 15% para *P. omorika* (Budimir y Vujicic, 1992), en *P. sitchensis* el 1% de los brotes obtenidos *in vitro* produjeron raíces espontáneamente (Drake *et al.*, 1997).

El enraizamiento fue nulo con la aplicación de  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB (Cuadro 11), al parecer esta hormona no le causó ningún efecto a los brotes individualizados, ya que no se formó callo en la base de los brotes ni les provocó algún cambio perceptible, los brotes continuaron con su crecimiento lento. En el segundo ensayo empleando AIB a la misma concentración pero adicionada a medio líquido, tampoco se indujo la formación de raíces. Mediante la aplicación de  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en medio líquido, después de 45 días ya se había desarrollado una raíz de 1.5 cm en un brote proveniente del lote al cual se le realizó un corte transversal en la base (Fig. 11a). La raíz alcanzó aproximadamente 27 mm de longitud, hasta donde sabemos es la primera vez que se logra la regeneración de una plántula completa de *P. chihuahuana* mediante cultivo de tejidos. Con el tratamiento de ANA  $5 \text{ mg l}^{-1}$ , en el que a todos los brotes se les realizó corte en la base, después de 30 días un brote de 5 cm empezó a desarrollar en la base una raíz blanca y más robusta en comparación a la que se había formado con la aplicación de  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA y a los pocos días surgieron dos raíces más (Fig. 11b). Alrededor de

los 40 días otro brote comenzó a desarrollar dos raíces en la parte superior del corte con un aspecto similar a las raíces del brote anterior. En ninguno de los brotes enraizados ni en los demás ocurrió la formación de callo. Al incrementar la concentración a  $10 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en medio sólido se desarrolló callo en la base de algunos brotes.

Para los casos en donde se utilizó medio sólido no se obtuvo respuesta, lo que parece indicar que al emplear medios líquidos la disposición de la auxina es mayor y el corte realizado a los brotes facilitó su penetración.

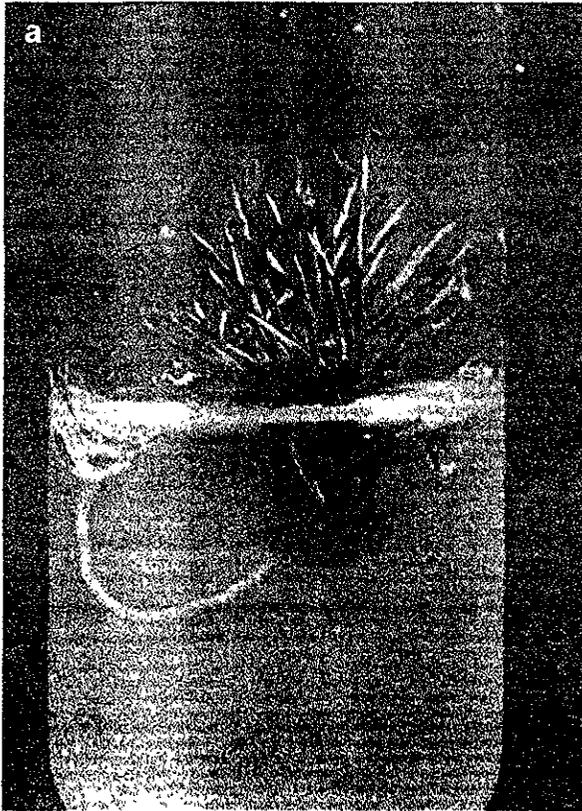
Las respuestas en la formación de raíces en brotes de *P. chihuahuana* han sido bajas, pero esta etapa es la más complicada en el cultivo *in vitro* de coníferas. Por ejemplo, en *P. elardica* los intentos por enraizar brotes *in vitro* han fracasado, sólo en un experimento empleando  $5 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA por 24 h se logró el enraizamiento de una brote de un total de 20 después de 6 semanas (Gladfelter y Phillips, 1987). En la mayoría de los trabajos en gimnospermas en lo que se logró enraizamiento, éste no se reporta sin la mediación de auxinas exógenas y aún así, la inducción de raíces ha sido difícil y sólo la han conseguido después de múltiples ensayos. Muchos de ellos reportan bajos porcentajes de plántulas completas. Por ejemplo, en *Pinus banksiana* la mayor formación de raíces se obtuvo cultivando los brotes en medio con ANA. Los porcentajes de enraizamiento variaron dentro de un rango de 40 a 75 %. Con AIB la formación de raíces fue nula o muy baja, menor del 5% (Harry y Thorpe, 1994). En otras especies de coníferas se ha logrado el enraizamiento utilizando mezclas de hormonas (Bergmann y Stomp, 1994) o mezclas de sustratos inertes adicionados con medio líquido y auxinas

(Harry *et al.*, 1995). Los métodos desarrollados han resultado más bien específicos, por lo que este grupo vegetal es de difícil enraizamiento (von Arnold y Eriksson, 1981; Bonga y von Aderkas, 1992; Martínez *et al.*, 1994).

Se han continuado los ensayos de enraizamiento de brotes para tratar de lograr porcentajes de enraizamiento elevados que permitirían tener definido en su totalidad el sistema de regeneración a partir de embriones inmaduros, sin embargo hasta ahora no se han logrado los resultados esperados.

**Cuadro 11.** Tratamientos para inducir enraizamiento de brotes adventicios formados a partir de embriones inmaduros de *P. chihuahuana*. ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ).

No. de brotes	Tratamiento	No. de brotes con raíz
15	SH sólido + AIB $3\ \text{mg l}^{-1}$ por 24 h	0
20	SH 50% líquido + AIB $3\ \text{mg l}^{-1}$ por 24 h	0
20	SH 50% líquido + ANA $3\ \text{mg l}^{-1}$ por 24 h	1
15	SH 50% líquido + ANA $5\ \text{mg l}^{-1}$ por 24 h	2
20	SH 50% sólido + ANA $10\ \text{mg l}^{-1}$ por 48 h	0



**Figura 11. a)** Desarrollo de raíz en un brote individualizado después de 45 días de haber dado un pulso con  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en medio líquido, **b)** Mediante la aplicación de ANA  $5 \text{ mg l}^{-1}$  en medio líquido, se logro el desarrollo de raíces más robustas y en menor tiempo (30 días).

## Cultivo de embriones inmaduros de diferentes poblaciones

Se estableció que la mejor condición para la inducción de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* es cultivarlos en medio SH adicionado con 5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina durante 30 días y posteriormente subcultivarlos a medio SH 50%.

Al cultivar *in vitro* embriones inmaduros de cuatro distintas poblaciones de *P. chihuahuana*, se pudo establecer que existe una respuesta diferencial en el porcentaje de germinación, en el Cuadro 12 se observa que el lote que presentó una mayor germinación fue el de Las Trojas (72.61%). Es importante señalar que este lote tenía 12 meses de almacenamiento a 6°C por lo que su condición fue diferente a la de las otras tres localidades que únicamente tenían dos meses de almacenamiento. El lote que menor porcentaje de germinación mostró fue el de Las Tinajas con 9.08 %. Las otras dos muestras de las localidades de El Ranchito y Louisiana presentaron un porcentaje de germinación similar, 18.69 y 20.36% respectivamente.

Al someter los resultados del Cuadro 12 a un análisis de varianza. Se pudo establecer que sí existe una diferencia significativa entre las 4 muestras ya que se encontró una  $p=0.0005$ . La prueba de rango múltiple de Tukey estableció una diferencia entre la muestra de La Tinaja respecto a las otras tres, El Ranchito, Louisiana y Las Trojas, ya que en estas últimas no se pudo establecer una diferencia significativa, por lo que se puede afirmar que el promedio de brotes generados por embrión es similar entre las últimas tres poblaciones citadas.

**Cuadro 12.** Respuestas de germinación y formación de brotes por embrión inmaduro de 4 distintas poblaciones de *P. chihuahuana* después de tres meses de iniciados los cultivos *in vitro*. ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h,  $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ).

Lote de semillas	No. de embriones con respuesta	Porcentaje de germinación	No. de brotes por embrión
La Tinaja	27/300	$9.08 \pm 9.88$	$3.05 \pm 1.69$ a
El Ranchito	56/300	$18.69 \pm 13.79$	$5.31 \pm 3.34$ b
Las Trojas	108/150	$72.61 \pm 18.66$	$5.85 \pm 3.52$ b
Louisiana	61/300	$20.36 \pm 21.62$	$6.53 \pm 3.72$ b

Letras diferentes indican diferencia significativa a  $p \leq 0.05$

Es sabido que la respuesta al cultivo de tejidos está mediada principalmente por el genotipo (Bergmann y Stomp, 1994) y el estado fisiológico del explante (Bonga, 1981). Existen diversos estudios que demuestran que diferentes genotipos de la misma especie responden de manera distinta al cultivo *in vitro*. Por ejemplo, se estableció diferencias en el número de brotes adventicios formados por embrión a partir de semillas de diferentes localidades, así como diferencias en la elongación de los brotes de *Pinus caribaea* (Go *et al.*, 1993), *P. populus*, *P. radiata* y *Picea abies* (Bergmann y Stomp, 1994) y mango (Litz *et al.*, 1998). En cultivos de *Pinus contorta* se reportara distintos porcentajes en la capacidad de formación de brotes adventicios entre cuatro muestras de semillas de distintas regiones (31, 37, 52 y 92% respectivamente) (von Arnold y Eriksson, 1981). Ledig,

*et al.* (1997) establecieron, mediante el estudio de la diversidad genética de *P. chihuahuana*, que sus poblaciones se han diferenciado por deriva génica y que están aisladas unas de otras, por lo que es de esperarse que la capacidad de formación de brotes sea distinta, debido a que las respuestas al cultivo *in vitro* están mediadas por las condiciones fisicoquímicas, por el estado fisiológico y en gran medida por las características genéticas del explante.

### **Efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de los brotes**

Después del periodo de inducción de los embriones cigóticos de *P. chihuahuana* (30 días), el desarrollo (diferenciación y elongación de los brotes) fue muy lento, aún con la reducción del medio a la mitad de sus componentes. Por tal motivo, se redujo el contenido de sacarosa de 15 g l<sup>-1</sup> (SH15) a 10 g l<sup>-1</sup> (SH10).

Se pudo establecer una diferencia significativa entre los dos medios de cultivo empleados ( $p=0.00018$ ). Los resultados se muestran en el Cuadro 13, en el cual se puede observar que la reducción del contenido de sacarosa en el medio (SH10) favoreció la elongación de los brotes; éstos alcanzaron en promedio una altura tres veces mayor a los que se mantuvieron en medio SH15, inclusive se logró el desarrollo de brotes con alturas de 10 a 12 mm en solo dos meses de estar en los medios de desarrollo. Esta altura se alcanzó en ensayos anteriores empleando el medio SH15 después de 4 a 5 meses.

**Cuadro 13.** Altura promedio alcanzada por brotes adventicios de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* después de tres meses de iniciados los cultivos, empleando dos diferentes concentraciones de sacarosa, 15 g l<sup>-1</sup> (SH15) y 10 g l<sup>-1</sup> (SH10)

Medio de desarrollo de brotes	Número de brotes	Altura promedio (mm) ± D.S.
SH15	25	1.36 ± 0.569 a
SH10	23	4.04 ± 2.738 b

Letras diferentes indican diferencia significativa a  $p \leq 0.05$   
D.S. = desviación estándar

La elongación de los brotes frecuentemente es un prerequisite para su enraizamiento (Bonga y von Aderkas, 1992). Al obtener brotes con una talla mayor y en menos tiempo, se abre la posibilidad de contar con una muestra más grande para realizar el enraizamiento y así poder obtener una mayor cantidad de plántulas en un periodo de tiempo menor.

Se ha reportado que el empleo de bajos contenidos de sacarosa puede inducir hiperhidratación (Bonga y von Aderkas, 1992). Esto no ocurrió en el presente trabajo. El desarrollo de los brotes fue inclusive de mejor aspecto, es decir, sus hojas eran de un verde cenizo con el tallo lignificado de color café.

Al realizar un segundo ensayo e incrementando la muestra, se pudo establecer mediante análisis de varianza que existe una diferencia significativa para el número de brotes formados por embrión ( $p=0.01691$ ), así como para la altura alcanzada por ellos ( $p=0.000001$ ). Los resultados que se presentan en el Cuadro 14 confirman lo obtenido anteriormente: el subcultivo de los embriones a

medio con menor contenido de sacarosa ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) promovió un desarrollo más acelerado de los brotes, éstos duplicaron la altura alcanzada respecto a los fueron subcultivados en medio SH15, inclusive se logró el desarrollo de brotes con 10 mm de altura en solo dos meses de estar en los medios de desarrollo, esta altura sólo se había alcanzado después de 4 a 5 meses en ensayos anteriores en medio SH15. El promedio de brotes por embrión generados y consolidados al subcultivarlos a medio SH10 fue mayor ( $18.400 \pm 1.802$ ) a los obtenidos en todos los ensayos que se realizaron previamente.

**Cuadro 14.** Número de brotes por embrión inmaduro y altura promedio alcanzada por los mismos después de tres meses de iniciados los cultivos, empleando dos diferentes concentraciones de sacarosa,  $15 \text{ g l}^{-1}$  (SH15) y  $10 \text{ g l}^{-1}$  (SH10)

Medio	Número de brotes	Número de brotes/embrión $\pm$ D.S.	Altura promedio (mm) $\pm$ D.S.
SH15	142	$12.364 \pm 4.864$ a	$2.613 \pm 1.154$ a
SH10	194	$18.400 \pm 1.802$ b	$4.160 \pm 3.781$ b

Letras diferentes indican diferencia significativa a  $p \leq 0.05$   
D.S. = desviación estándar

Generalmente se han utilizado medios diluidos y sin hormonas para estimular el desarrollo de los brotes adventicios. Por ejemplo, en *P. contorta* se obtuvo un mayor desarrollo empleando medios a 1/4 de su concentración original, incluyendo la sacarosa (von Arnold y Eriksson, 1981; Thorpe y Harry, 1991).

Los carbohidratos tienen muchas funciones en el cultivo de tejidos, son la fuente para el crecimiento de las células que son expuestas a intensidades de luz que no son fotosintéticamente activas que normalmente se usan en el cultivo de tejidos. También sirven como agentes osmóticos y en algunas ocasiones producen efectos morfogenéticos distintos. Muchos cultivos son dependientes de la fuente de carbono hasta que están listos para la aclimatización (Bonga y von Aderkas, 1992). Algunos investigadores han logrado desarrollar cultivos que crecen en medios bajos en carbohidratos y expuestos a altos niveles de dióxido de carbono e intensidad luminosa. Esto obliga a los explantes a depender de su aparato fotosintético para el suministro de carbono, más que del azúcar en el medio nutritivo, lo que se ha traducido como un incremento real en su biomasa, mejorando su desarrollo en general y facilitando el trasplante a suelo (Kozai *et al.*, 1988).

En muchos cultivos de coníferas la iniciación de brotación adventicia requiere altas concentraciones de sacarosa y menores para la elongación de los brotes (Thompson y Thorpe, 1987), por lo que la necesidad de carbohidratos parece ser específica para cada estado de desarrollo, es decir, son promotores durante la formación pre-meristemoide, pero pueden llegar a ser inhibitorios en las etapas subsecuentes (Bonga y von Aderkas, 1992).

Cuando la sacarosa se usa en altas concentraciones en el medio se pueden producir consecuencias negativas, por ejemplo los carbohidratos estimulan la producción de compuestos fenólicos, los cuales pueden causar oxidación excesiva. Los contenidos fenólicos en células de *Acer pseudoplatanus* en cultivos

en suspensión incrementaron rápidamente con 2% de sacarosa en el medio (Phillips y Henshaw, 1977, citado por Bonga y von Aderkas, 1992). La exposición de células de *Vitis vinifera* a altas concentraciones de sacarosa o manitol produjeron un estrés hídrico y la formación de antocianinas (Do y Cormier, 1990, citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

Para las coníferas, uno o más cambios se realizan en el medio una vez que los brotes se han formado y la elongación se va a iniciar. El contenido de minerales es reducido a la mitad de su concentración, las hormonas son reducidas o eliminadas, el amonio es desechado y se adiciona carbón activado. Además, la concentración de sacarosa en el medio es reducida (Bonga y von Aderkas, 1992).

La sacarosa es hidrolizada por la invertasa en glucosa y fructosa, de éstos azúcares, la glucosa es tomada de manera preferencial; ésta tiene dos funciones principales una vez que entra a la célula: la aportación de energía y el suministro de los esqueletos de carbón para los componentes celulares, incluyendo la pared celular. La sacarosa es el carbohidrato más empleado. En muchas especies es la forma en la cual los carbohidratos son traslocados y algunas veces almacenados (Bonga y von Aderkas, 1992). La sacarosa incrementa la presión osmótica, estimulando la actividad mitocondrial y esto, presumiblemente, produce la energía requerida para la iniciación de los brotes

## Estudio fisiológico de los brotes de *P. chihuahuana*

Al medir la cantidad de sacarosa empleada por los explantes en medio SH15, se pudo reconocer que cada 100 mg de tejido fresco consumen alrededor de 1.92 g de sacarosa en 30 días de cultivo (Cuadro 15). Estos datos indican que los brotes adventicios de *P. chihuahuana* utilizan 11.49% de la sacarosa del medio de cultivo para obtener carbono como fuente de energía en la etapa de desarrollo de los brotes.

**Cuadro 15.** Utilización de sacarosa del medio SH15 por 100 mg de tejido de embriones con primordios de brote de *P. chihuahuana* en 30 días de cultivo.

Medio 30 días	g l <sup>-1</sup> de sacarosa	Reducción de sacarosa (%)	Consumo de sacarosa
Medio s/explantes	16.7	0	0
Medio c/explantes	14.78	11.49	1.92 g

## Fotosíntesis

Los resultados de la medición de fijación de CO<sub>2</sub> para brotes adventicios de *P. chihuahuana* se presentan en el Cuadro 16. Al realizar el análisis de varianza se puede establecer una diferencia significativa ( $p=0.000053$ ). Mediante el análisis de rango múltiple, se puede establecer que la sacarosa adicionada al medio de cultivo afecta la fotosíntesis entre los diferentes tratamientos. Se determinó una

diferencia significativa entre los explantes que se encontraban con el medio de inducción (SH 5 mg l<sup>-1</sup>, K), así como la mayoría de los tratamientos subcultivados en SH15, con respecto a aquellos que se encontraban en el medio SH10 y el control. Los explantes que se encontraban en el medio de inducción no presentaron fijación de CO<sub>2</sub>, por lo que se puede considerar que todavía no son capaces de realizar fotosíntesis. Al ser estructuras juveniles, generalmente necesitan un aporte de energía para su desarrollo, en las semillas lo obtienen del material de reserva (megagametofito), el cual emplean para su germinación y para las primeras etapas de desarrollo. En el caso del cultivo de tejidos, la fuente de energía la obtienen de la sacarosa del medio de cultivo, así como de los diversos compuestos orgánicos e inorgánicos presentes. Las hormonas juegan un papel importante en esta etapa inicial, volviendo competentes a los explantes e induciendo las respuestas organogénicas, en este caso, la formación y desarrollo de brotes adventicios, por lo que es de esperarse que estos explantes no contengan un aparato fotosintético completamente desarrollado y/o activo.

Se ha reportado que los reguladores del crecimiento y la fuente de carbohidratos afectan la capacidad fotosintética en los cultivos (Lee *et al.*, 1985). Para llevar a cabo la fotosíntesis las plántulas *in vitro* deben haber alcanzado cierto grado de diferenciación. Dependiendo del estado de desarrollo y por lo tanto de la elaboración de la maquinaria fotosintética, las plántulas pueden mostrar diferentes respuestas a las condiciones de crecimiento y diferente capacidad de fijar CO<sub>2</sub> (Desjardines, 1995). Lo anterior confirma lo encontrado en los explantes que se encontraban en medio de inducción, lo que al estar en una fase de

reorganización de sus componentes celulares mediada principalmente por los reguladores del crecimiento, debieron tener un aparato fotosintético pobremente desarrollado, con la consecuencia de que no pudieron llevar a cabo fotosíntesis y dependieron del medio de cultivo y de la sacarosa para su crecimiento, como lo mostró la medición de CO<sub>2</sub> en los embriones de *P. chihuahuana* en medio de inducción y con medio con sacarosa 15 g l<sup>-1</sup>, en donde no se registró fotosíntesis.

**Cuadro 16.** Fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico en brotes adventicios provenientes de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* en diferentes medios y días de cultivo.

Medio	días de cultivo	ppm CO <sub>2</sub> fijado min <sup>-2</sup> g <sup>-1</sup> t.f.
SHK	6	-118.4 ± 103.1 a
SHK	45	-49.2 ± 28.9 a
SH15	30	-27.7 ± 28.1 b
SH15	105	-5.4 ± 20.3 b
SH15	120	-3.2 ± 6.2 b c
SH15	60	33.4 ± 25.5 b c
Control *	60	44.7 ± 22.1 b c d
SH10	105	60.2 ± 52.9 c d
SH10	90	91.4 ± 20.6 c d
Control *	90	105.5 ± 44.1 d
SH10	150	164.2 ± 45.2 d

\* Plántulas obtenidas de la germinación de semillas creciendo en invernadero  
 SHK = Explantes en medio de inducción (SH + 5 mg l<sup>-1</sup> de K)  
 n = 3 a 5 explantes por tratamiento

El subcultivar los explantes a un medio diluido y sin hormonas es una práctica común para lograr el desarrollo de los brotes adventicios, en donde su condición fisiológica es muy diferente a la de inducción. Para el caso de los explantes de *P. chihuahuana* en medio de inducción y aquellos subcultivados a SH15 tampoco se registró fijación de CO<sub>2</sub>, es decir, los explantes continuaron

tomando la fuente de carbón del medio de cultivo para su crecimiento y desarrollo, manteniendo una alimentación heterotrófica. Solamente en un caso, los explantes cultivados en SH15, mostraron fijación de CO<sub>2</sub> (Cuadro 16). En aquellos explantes que fueron subcultivados a medio SH al 50% de su concentración de sales pero con sacarosa 10 g l<sup>-1</sup> (SH10) se pudo detectar la fijación de CO<sub>2</sub>, volviendo los cultivos de heterotróficos a fotomixotróficos. Es importante señalar que las plántulas germinadas a partir de semillas y en condiciones de invernadero (control) mostraron niveles de fijación de CO<sub>2</sub> similares a los brotes subcultivados en SH10, inclusive los brotes de más edad presentaron una fijación mayor, por lo que se puede suponer que el aparato fotosintético de las plántulas obtenidas mediante la germinación de semilla y los brotes adventicios obtenidos por brotación múltiple tienen un aparato fotosintético fisiológicamente similar, si se toma en cuenta que la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> atmosférico fue similar y que presumiblemente tienden a alcanzar los niveles de fijación que mostró una planta de 2 años de edad (267.9 ppm CO<sub>2</sub> min<sup>-2</sup> g<sup>-1</sup> t.f.).

En cultivos de *Liquidambar styraciflua* las plántulas cultivadas *in vitro* presentaron tasas fotosintéticas más altas, mayor contenido de clorofila, pocos gránulos de almidón y variación en el desarrollo de cloroplastos, en comparación a plántulas *in vivo* bajo las mismas condiciones de cultivo (Lee *et al.*, 1985).

La considerable limitación de la tasa de fotosíntesis neta se traduce en una limitación similar en el crecimiento, medido como la proporción de acumulación de materia seca (Solárová, 1989 citado por Čatsky *et al.*, 1995).

Se puede observar en el Cuadro 16 que los explantes subcultivados en medio SH10 presentaron actividad fotosintética y solamente en un caso (SH15 con 60 días de cultivo) también se cuantificó fijación de CO<sub>2</sub>, aunque ésta fue menor. La fotosíntesis de las plantas en suelo fue un poco mayor (105.5 ppm CO<sub>2</sub> fijado min<sup>-2</sup> g<sup>-1</sup> t.f.) a la de *in vitro* 90 días (91.36 ppm CO<sub>2</sub> fijado min<sup>-2</sup> g<sup>-1</sup> t.f.), ambos se encontraban bajo las mismas condiciones de cultivo, es decir, misma temperatura, fotoperiodo e intensidad luminosa, por lo que el estado de desarrollo del aparato fotosintético de los brotes debe ser muy parecido al de las plántulas en suelo y al disminuir la concentración de sacarosa, posiblemente se permitió un mejor desarrollo del aparato fotosintético, pasando de una condición heterotrófica que se presenta en los explantes cultivados en medio de inducción y SH15, a una mixotrófica o autotrófica, para los explantes cultivados en SH10. Lo anterior se reflejó en el mayor desarrollo de los brotes (Cuadro 14).

Para cultivos *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* se encontró que la máxima fotosíntesis neta *in vitro* alcanzó los mismos niveles a los reportados para árboles. Además, encontraron que la concentración de sacarosa afecta la tasa de fotosíntesis neta (Evers, 1982, citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

En cultivos *in vitro* de *Brassica oleracea* determinaron que los cultivos tienen una baja capacidad fotosintética. Se encontró que los cultivos no podían fijar niveles adecuados de CO<sub>2</sub> para un crecimiento autotrófico y eventualmente morían si se les cultivaba en medio sin sacarosa (Grout y Ashton, 1978). En plantas *in vitro* de frambuesa se encontró que la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> fue sólo alrededor de un cuarto en comparación al control, indicando que la sacarosa y las

condiciones de cultivo afectan la capacidad fotosintética de las plantas *in vitro* (Donnelly *et al.*, 1985). En cultivos en suspensión de *Picea abies* el incremento en la concentración de sacarosa en el medio estimuló el crecimiento celular, pero se inhibió la síntesis de clorofilas. Cuando las células fueron subcultivadas a concentraciones menores, inclusive sin sacarosa, la concentración de clorofilas fue mayor pero el crecimiento fue más lento (Simola *et al.*, 1992). En plántulas de *Spathiphyllum* subcultivadas a medio con sacarosa 6% la fotosíntesis neta fue sólo del 40% que el de las plántulas multiplicadas con sacarosa 3%. Las plantas cultivadas con altas concentraciones de azúcar tuvieron inicialmente menos clorofilas. Plántulas de *Spathiphyllum* cv. Petite cultivadas *in vitro* con 3% de sacarosa mostraron una fotosíntesis neta positiva al final del periodo *in vitro*. Altos contenidos de sacarosa permitieron un incremento en el peso fresco, un descenso en la fotosíntesis neta, así como, un contenido más bajo de clorofila (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996). Relaciones similares entre concentración de sacarosa y capacidad fotosintética *in vitro* han sido encontradas en otras especies; por ejemplo, en rosa (Langford y Wainwright, 1987; Capellades *et al.*, 1991) papa (Kozai *et al.*, 1988), coliflor (Grout y Donkin, 1987), frambuesa (Deg y Donnelly, 1993) *Clematis* (Lees *et al.*, 1991) y fresa (Hdider y Desjardins, 1994 citados por Van Huylenbroeck y Debergh, 1996). Langford y Wainwright (1987) demostraron la correlación inversa existente entre la sacarosa del medio y la fotosíntesis. Al disminuir la concentración de sacarosa en el medio se incrementó la fotosíntesis en brotes de dos cultivares de rosa cultivados *in vitro*. Con 40 g l<sup>-1</sup> de sacarosa las plántulas tiene una actividad fotosintética de alrededor de 250 mg CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>,

mientras que con  $10 \text{ g l}^{-1}$  fue alrededor de  $350 \text{ mg CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Al parecer las plántulas de rosa necesitan una cantidad mínima de azúcar para crecer normalmente, ya que las plántulas subcultivadas a  $2.5 \text{ g l}^{-1}$  mostraron síntomas de hiperhidratación y eventualmente murieron. La cantidad de mínima de azúcar requerida para cubrir las necesidades fisiológicas básicas de las plántulas y maximizar la fotosíntesis es todavía un asunto en debate. El suministro *in vitro* de azúcar exógeno reduce la fotosíntesis neta, debido a una disminución de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco) (Langford y Wainwright, 1987; Desjardins *et al.*, 1994, citados por Van Huylenbroeck y Debergh, 1996; Kozai *et al.*, 1997). Además, se ha observado que altas concentraciones de carbohidratos en el medio pueden ocasionar la pérdida de proteínas del aparato fotosintético (Koch, 1996, citado por Tichá *et al.*, 1998).

Al reducir los niveles de sacarosa en el medio no solamente se reduce el posible potencial osmótico negativo que ejerce el medio sobre el explante (George y Sherrington, 1984), asimismo, permite un incremento en la fotosíntesis, probablemente mediante el incremento en la eficiencia de Rubisco (Triques *et al.*, 1997), posibilitando al parecer la maduración del aparato fotosintético para desarrollar brotes con una condición fotomixotrófica (parte de la energía para su metabolismo la toman de sacarosa y parte de su capacidad de fijar y metabolizar el  $\text{CO}_2$ ) o una autotrófica (mediante fotosíntesis fijan  $\text{CO}_2$  para sus procesos metabólicos).

Lo mencionado anteriormente podría explicar en parte por qué los explantes subcultivados a medio SH10 presentan un mayor grado de desarrollo (Cuadro 14)

y poseen una actividad fotosintética comparable en algunos casos a la de plántulas en suelo (Cuadro 16). Estos aspectos son importantes ya que las posibles plántulas que se generen *in vitro* tendrían una condición fisiológica favorable que les permitiría tener una mejor aclimatización bajo condiciones de invernadero.

La disminución de la capacidad fotosintética no solamente está influida por la sacarosa en el medio, gran parte se debe al agotamiento de CO<sub>2</sub> en el contenedor durante el periodo de luz con baja irradiación (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996).

Al comparar cultivos de células de papa desarrollados en un medio heterotrófico con un fotomixotrófico, se determinó que en este último se obtuvo un mayor crecimiento en peso fresco y seco después que la sacarosa se agotó en el medio, indicando que las células fotomixotróficas habían incrementado su eficiencia o fijación de CO<sub>2</sub> para obtener carbón adicional. Las células heterotróficas cesaron su crecimiento un poco después que la sacarosa fue utilizada por completo del medio. En cambio, las células fotomixotróficas ganaron 25% de su peso seco y 45% de su peso fresco después que la sacarosa no se encontraba presente en el medio (La Rosa *et al.*, 1984).

## **Clorofilas**

- A pesar que no se pudo establecer diferencia significativa para la cantidad de clorofila a, b y total; se puede argumentar con base a los resultados del Cuadro 17 que las cantidades de clorofilas encontradas en explantes cultivados *in vitro* en

tres diferentes medios nutritivos, diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de sacarosa, en ningún caso alcanzaron la cantidad de clorofila a y b cuantificada para la plántula cultivada en suelo bajo las mismas condiciones, con 174.2 y 76.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  tf respectivamente.

**Cuadro 17.** Cantidad de clorofila a, b, total y proporción de a/b en brotes de *P. chihuahuana* desarrollados bajo diferentes medios y tiempos de cultivo.

Medio	Días de cultivo	Clorofila a ( $\mu\text{g g}^{-1}$ tf) $\pm$ D.S.	Clorofila b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ tf) $\pm$ D.S.	Clorofila total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ tf) $\pm$ D.S.	Proporción a/b $\pm$ D.S.
Control*	90	174.2 $\pm$ 32.3	76.7 $\pm$ 43.5	250.8 $\pm$ 74.1	3.4 $\pm$ 1.05
SHK	15	29.4 $\pm$ 14.0	23.2 $\pm$ 6.0	52.6 $\pm$ 20.0	1.2 $\pm$ 0.3
SH15	45	44.9 $\pm$ 7.2	15.2 $\pm$ 4.1	60.1 $\pm$ 8.24	9.3 $\pm$ 6.8
SH15	60	82.2 $\pm$ 12.6	19.9 $\pm$ 4.4	102.1 $\pm$ 17.0	4.3 $\pm$ 0.4
SH15	105	102.3 $\pm$ 19.7	42.6 $\pm$ 9.8	144.9 $\pm$ 27.8	2.6 $\pm$ 0.5
SH15	120	92.3 $\pm$ 31.9	35.9 $\pm$ 6.81	128.2 $\pm$ 33.2	2.7 $\pm$ 0.8
SH10	90	103.7 $\pm$ 19.6	42.3 $\pm$ 14.2	146.0 $\pm$ 30.1	3.7 $\pm$ 1.4
SH10	105	127.9 $\pm$ 19.2	45.7 $\pm$ 7.8	173.6 $\pm$ 27.0	3.9 $\pm$ 0.3

\* Plántulas obtenidas de la germinación de semillas creciendo en invernadero  
 SHK = Explantes en medio de inducción (SH + 5 mg l<sup>-1</sup> de K)  
 D.S. = desviación estándar

Los explantes cultivados *in vitro* a 105 y 90 días en SH10 presentaron las más altas concentraciones de clorofilas, seguidas por los explantes de los cultivos en SH15 de 105 y 120 días. En el resto la concentración fue baja lo que podría indicar que los cultivos en esas etapas de desarrollo dependen en su totalidad de la fuente de carbono proporcionada por el medio de cultivo para su desarrollo, ya que no realizan fotosíntesis. En estudios similares con *Brassica oleracea*, el contenido de clorofilas de los cultivos *in vitro* estuvo siempre por debajo del contenido de las plantas control (Grout y Ashton, 1978). La síntesis de clorofila es

suprimida específicamente por la sacarosa en cultivo de callo de zanahoria, ésta reduce tanto la complejidad del cloroplasto como el número de éstos por célula (Edelman y Hanson, 1972). Plántulas de *Spathiphyllum* cv. Petite cultivadas *in vitro* con 6% de sacarosa tuvieron menor contenido de clorofilas en comparación a las que se cultivaron con 3% (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996).

Los brotes cultivados en SH15 mostraron una capacidad fotosintética limitada, lo cual se vio corroborado por una concentración menor de clorofilas (Cuadro 17). Generalmente la medición de bajas tasas fotosintéticas en plántulas *in vitro* estuvo acompañada por un bajo contenido de clorofila (Lee *et al.*, 1985).

Las proporciones de clorofilas a/b para los explantes cultivados en SHK y SH15 fueron muy diferentes a la del control. Se han encontrado proporciones más bajas de clorofila a/b en plántulas cultivadas *in vitro* que en plántulas germinadas de semillas en invernadero de *Liquidambar styraciflua* (Lee *et al.*, 1985). Solamente los brotes adventicios cultivados en medio SH10 presentaron una proporción de clorofilas a/b similar al control, indicando que posiblemente los brotes se encontraban en un estado de desarrollo similar al de las plántulas germinadas en suelo. Resultados similares se encontraron en plántulas de coco derivadas de embriones cigóticos, en donde el contenido de clorofila y la proporción de clorofilas a y b en la fase final del cultivo *in vitro* previo a su trasplante a suelo no varió significativamente respecto al de las plantas control (Triques *et al.*, 1985).

Van Huylenbroeck y De Riek (1995) indican que tanto un contenido alto de clorofila y una relación mayor de clorofila a en comparación a la b son indicativos

de una eficiencia fotosintética mejorada. Lo cual se puede encontrar en los cultivos *in vitro* de *P. chihuahuana* con sacarosa 10% (SH10) (Cuadro 17).

En general, el contenido de clorofila de las plántulas *in vitro* es comparable a la de las plantas control que crecen bajo condiciones similares de luz. Sin embargo la condición de la luz puede afectar el contenido de clorofila. Con una baja intensidad luminosa, una condición que normalmente se encuentra en los cultivos *in vitro*, la membrana de los tilacoides no está diferenciada dentro de la pila de tilacoides y estos están irregularmente arreglados. Como consecuencia, las plántulas *in vitro* pueden mostrar una fotosíntesis pobre si se transfieren a intensidades de luz más altas. Existen muchos resultados que sugieren que, bajo condiciones *in vitro* sin control, el agotamiento de CO<sub>2</sub> por la actividad fotosintética de las plántulas o inhibición del ciclo de Calvin por el azúcar resulta en un flujo excesivo de electrones en la membrana de los tilacoides causando fotoinhibición y fotooxidación y por lo tanto se reduce la fotosíntesis y se desactiva Rubisco (Desjardines, 1995).

Los altos niveles de azúcar que están presentes en la mayoría de los medios para cultivo de tejidos se han relacionado con la represión del desarrollo de cloroplastos y su capacidad fotosintética. Las formas de represión del azúcar sobre el desarrollo del cloroplasto están poco documentadas. La sacarosa puede inhibir la actividad fotosintética por dos vías: La primera, la sacarosa puede inhibir la fijación de CO<sub>2</sub>. Segundo, la sacarosa puede estimular la división celular y crecimiento los cuales son procesos antagónicos a la acumulación de clorofilas. (La Rosa *et al.*, 1984).

El ciclo de Krebs es importante para la biogénesis celular, como una fuente de succinil CoA para la síntesis de clorofila y para el suministro de amino ácidos para las proteínas de la membrana tilacoidal. La sacarosa puede por lo tanto inhibir el desarrollo del cloroplasto mediante la reducción de los suministros de los intermediarios del ciclo de Krebs, ya sea bloqueando el ciclo o mediante la disminución de los intermediarios disponibles para las reacciones sintéticas (Edelman y Hanson, 1972).

### **Peroxidasas**

En el Cuadro 18 se puede observar que la concentración de las peroxidasas tanto unidas como solubles en las plántulas control presentan en general una actividad baja, muy similar a los cultivos en SH10 que son los que mostraron la actividad más baja. Al aplicar el análisis de varianza, se encontró que existe una diferencia altamente significativa ( $p=0.000001$ ); se pudo establecer que en las peroxidasas solubles el tratamiento en el medio de inducción por 45 días es diferente al resto de los tratamientos. En las peroxidasas unidas se encontró que la enzima esta presente en mayor cantidad en los tratamientos en el medio de inducción, así como en aquellos subcultivados a SH15 con menores días de cultivo. De manera general se podría afirmara que los brotes adventicios subcultivados en medio SH10 presentan un mayor crecimiento; esto justifica la baja concentración de peroxidasa encontradas, ya que a éstas se les asocia de manera inversa con el crecimiento (alargamiento celular y baja lignificación de las paredes celulares). Se ha postulado que las peroxidasas de la pared celular tienen

un papel clave en el endurecimiento de la pared celular y por lo tanto en la disminución (cesación) de la elongación en el crecimiento celular. Decece la extensibilidad de la pared celular mediante la formación de puentes difenil entre los polimeros de la pared, como hidroxiprolina, pectinas y hemicelulosa (Fry, 1986 citado por Sánchez *et al.*, 1995). Los explantes cultivados en medio de inducción (SHK) a 45 días de cultivo son los que mayor concentración de peroxidasas presentaron, esto se puede deber en parte a que no hay incremento de biomasa sino que existe una reorganización de sus células que darán origen a los brotes adventicios y no existe un crecimiento significativo de su biomasa, posiblemente las nuevas células que se están formando poseen una mayor cantidad de enzima para la formación de las paredes celulares.

**Cuadro 18.** Concentración de peroxidasas en brotes adventicios provenientes de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* en diferentes medios y días de cultivo.

Medio	días de cultivo	Solubles $\pm$ D.S. (D.O. $\text{min}^{-2} \text{g}^{-1}$ t.f.)	Unidas $\pm$ D.S. (D.O. $\text{min}^{-2} \text{g}^{-1}$ t.f.)
Control*	90	24.78 $\pm$ 33.77 a	71.31 $\pm$ 33.77 a
SHK	6	160.73 $\pm$ 106.7 a	366.17 $\pm$ 152.27 b
SHK	45	544.62 $\pm$ 284.7 b	563.64 $\pm$ 121.05 b
SH15	30	100.28 $\pm$ 32.94 a	429.73 $\pm$ 99.08 b
SH15	60	96.41 $\pm$ 35.25 a	450.18 $\pm$ 125.04 b
SH10	90	19.74 $\pm$ 3.19 a	69.14 $\pm$ 20.20 a
SH15	105	23.39 $\pm$ 11.13 a	121.71 $\pm$ 56.28 a
SH10	105	23.34 $\pm$ 11.13 a	50.29 $\pm$ 8.96 a
SH15	120	19.42 $\pm$ 6.60 a	130.76 $\pm$ 38.63 a

\* Plántulas obtenidas de la germinación de semillas creciendo en invernadero

SHK = Explantes en medio de inducción (SH con 5 mg l<sup>-1</sup> de K)

n = 3 a 5

D.S. = desviación estándar

La concentración de peroxidasas disminuyó en los cultivos en SH15, en donde se están consolidando los brotes y comienza su desarrollo, pero como se ha venido mencionando, la sacarosa parece estar ejerciendo un efecto negativo en el desarrollo de los brotes adventicios, lo cual se refleja en el contenido de peroxidasas presentes en los tejidos. La disminución de la sacarosa a  $10 \text{ g l}^{-1}$  ha mostrado ejercer un efecto positivo para el crecimiento de los brotes adventicios de *P. chihuahuana*, en donde la concentración de la enzima fue menor, inclusive a la del control, lo cual también se tradujo en un mayor crecimiento de los brotes.

Las peroxidasas son responsables del montaje de ligninas y proteínas en la pared celular. Existe una gran cantidad de evidencias que muestran que una alta actividad peroxidasa está correlacionada con la reducción del crecimiento vegetal en hipocótilos de frijol (Goldberg *et al.*, 1987), hipocótilo de cacahuete (Zheng y van Huystee, 1992) y sorgo enano (Schertz *et al.*, 1971) (citados por Tse-Min y Yaw-Huei, 1995). En hipocótilos de *Pinus pinaster* se cuantificó la actividad peroxidasa encontrando mayores niveles de la enzima en el momento que el crecimiento del hipocótilo cesó (Sánchez *et al.*, 1995). El análisis de dos genotipos de *Festuca arundinacea* con diferentes longitudes de elongación de hoja, mostró que un incremento en la actividad de la peroxidasa unida a pared celular esta asociada con el cese de la elongación de la hoja (MacAdam *et al.*, 1992). Por el contrario, pecíolos de *Ranunculus sceleratus* cuando se les trató con etileno, mostraron un incremento en su crecimiento y una baja actividad peroxidasa (Horton, 1993).

En plántulas de arroz se determinó que la peroxidasa unida a pared está inversamente relacionada al crecimiento de coleoptilos y raíces que crecen en presencia y ausencia de O<sub>2</sub>. La actividad de la peroxidasa decrece cuando el coleoptilo se alarga en el periodo inicial de crecimiento y hay un incremento cuando la elongación cesa durante el último periodo; lo mismo sucede con el crecimiento de la raíz (Tse-Min y Yaw-Huei, 1995).

El papel negativo de la peroxidasa en el crecimiento, particularmente la unida a pared celular, también es observado en el crecimiento regulado por etileno en brotes de *Pharbitis nil* (Prasad y Cline, 1987), células del epicótilo de chícharo (Ridge y Osborne, 1970). Varias plantas como camote (Gahagan *et al.*, 1968; Bueschner *et al.*, 1975), pepino (Retig y Rudich, 1972; Sterner y Hammerschmidt, 1985; Abeles *et al.*, 1988) y tabaco (van Loon y Antoniow, 1982) también mostraron relaciones similares entre el incremento de la inducción con etileno en la actividad peroxidasa y la inhibición del crecimiento (Tse-Min y Yaw-Huei, 1995).

Se ha sugerido un gran número de funciones de la peroxidasa durante el crecimiento y desarrollo (Van Huystee, 1987). La tasa de crecimiento de órganos axilares ha sido ampliamente asociada con diferencias en la actividad de peroxidases. Una correlación inversa entre actividad enzimática y tasa de crecimiento se ha encontrado para los ejes de plantas dicotiledoneas. Esta correlación ha sido encontrada no sólo para diferentes edades de plántulas sino también de diferentes regiones a lo largo del eje de la planta (Goldeberg *et al.*, 1989 citado por Sánchez *et al.*, 1995).

## **Invertasas**

La actividad de las invertasas nos indica de manera indirecta la capacidad que poseen los explantes en romper la sacarosa en glucosa y fructosa para que pueda ser utilizada por las células vegetales. Los datos del Cuadro 19 muestran que los embriones sembrados en medio SHK a 6 días de cultivo son diferentes significativamente ( $p=0.000001$ ) al resto de los demás tratamientos (solubles y unidas), es decir, son los que presentan una actividad invertasa más alta que el resto de las muestras. Esto se puede deber a que las semillas, al estar en imbibición por 24 horas comienzan el proceso que desencadenan la germinación y al momento de realizar la disección del embrión el megagametofito liberan una gran cantidad de almidón, parte de éste es absorbido por el embrión y al ser sembrado en un medio con una alta concentración de sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ) utiliza estos carbohidratos para su desarrollo, ya que no se lleva a cabo fotosíntesis todavía, motivo por el cual presentan una alta concentración de invertasas. El control también mostró una actividad alta, debido posiblemente a que en el periodo en que se cuantificó todavía presentaba una gran cantidad de almidón como reserva que absorbió del megagametofito, ya que este permanece unido a la plántula alrededor de 40 a 50 días. Cabe mencionar que en un ensayo previo con una planta de más de 2 años de edad la concentración de invertasa fue de  $8.97 \text{ D.O. min}^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ t.f.}$  para las solubles y  $0.29 \text{ D.O. min}^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ t.f.}$  para las unidas. En los explantes cultivados en SHK a los 45 días y en los subcultivados a SH15, 30 y 60 días, la actividad de las enzimas disminuyó considerablemente y esta disminución fue más notoria cuando se cuantificó a los 105 y 120 días de cultivo, por lo que se

podría presumir que en este medio de cultivo al ir creciendo los explantes comenzarán a presentar cierta actividad fotosintética (Cuadro 16), aunque menor que la de los explantes subcultivados en SH10, en donde se encontró la menor cantidad de invertasas, sobre todo de la unida a pared. Estos datos sugieren que los explantes pasan de una condición completamente heterotrófica (SHK y SH15, 30 y 60 días) a una posible condición fotomixotrófica (SH15, 105 y 120 días) y posiblemente a una condición fotomixotrófica más cercana a la autotrofia (SH10, 90 y 105 días).

**Cuadro 19.** Concentración de invertasas en brotes adventicios provenientes de embriones inmaduros de *P. chihuahuana* en diferentes medios y días de cultivo.

Medio	días de cultivo	Solubles $\pm$ D.S. (D.O. $\text{min}^{-2} \text{g}^{-1} \text{t.f.}$ )	Unidas $\pm$ D.S. (D.O. $\text{min}^{-2} \text{g}^{-1} \text{t.f.}$ )
Control	90	46.99 $\pm$ 18.55 b c	17.756 $\pm$ 10.62 a
SHK	6	71.958 $\pm$ 39.99 c	70.79 $\pm$ 36.37 b
SHK	45	6.156 $\pm$ 4.78 a	12.96 $\pm$ 4.49 a
SH15	30	6.29 $\pm$ 4.97 a	12.80 $\pm$ 4.22 a
SH15	60	8.38 $\pm$ 6.09 a b	19.04 $\pm$ 0.92 a
SH15	105	3.49 $\pm$ 2.42 a	7.58 $\pm$ 4.98 a
SH15	120	2.96 $\pm$ 1.79 a	5.69 $\pm$ 1.34 a
SH10	90	1.13 $\pm$ 0.51 a	1.42 $\pm$ 0.92 a
SH10	105	1.92 $\pm$ 1.24 a	3.55 $\pm$ 1.36 a

\* Plántulas obtenidas de la germinación de semillas creciendo en invernadero

SHK = Explantes en medio de inducción (SH con 5 mg  $\text{l}^{-1}$  de K)

n = 3 a 5

D.S. = desviación estándar

Tradicionalmente se ha considerado que los explantes y brotes regenerados mediante cultivo de tejidos tienen una capacidad fotosintética pobre. Asumiendo que las plántulas requieren azúcar en el medio de cultivo como una fuente de energía, se han cultivado predominantemente bajo condiciones

heterotróficas (mediante un suministro artificial de fuente de carbono como con la sacarosa) y bajo condiciones fotomixotróficas (con una fuente de carbono suministrada artificialmente y la producida fotosintéticamente) (Kozai *et al.*, 1997).

La actividad fotosintética de plántulas cultivadas autotrófica o fotomixotróficamente en substratos con agar *in vitro*, está frecuentemente limitada por una concentración baja de CO<sub>2</sub> y baja irradiación durante el periodo luminoso, afectado por la alta humedad relativa, incremento de etileno, etc.

En los cultivos *in vitro* los niveles de CO<sub>2</sub> en los contenedores frecuentemente decaen rápidamente hasta al punto de compensación, éste se prolonga por alrededor del 75% del periodo de luz, con lo que la fotosíntesis es cercana a cero (Solárová, 1989 citado por Čatsky, 1995).

Sin embargo, se ha revelado que las plántulas ya clorofilicas poseen capacidad fotosintética y crecen mejor, en algunos casos, bajo condiciones fotoautotróficas (sin un suministro artificial de la fuente de carbono) que en las condiciones hetero o fotomixotróficas, cuando el ambiente químico y físico son adecuadamente controlados para la fotosíntesis. Se puede esperar que plántulas regeneradas de embriones o brotes adventicios en una fase heterotrófica o fotomixotrófica puedan pasar fácilmente a una fase fotoautotrófica si se les provee con un microambiente adecuado para la fotosíntesis (Seko y Nishimura, 1996, citado por Kozai *et al.*, 1997). Los brotes subcultivados con menores cantidades de sacarosa como en el medio SH10, probablemente posean una edad fisiológica y estado de desarrollo que les ha permitido que su aparato fotosintético se encuentre desarrollado, que posean una cantidad de clorofila cercana a las de las

plantas control, que puedan realizar una mejor y mayor fijación de CO<sub>2</sub> y que posean una menor actividad de peroxidasas e invertasas, traduciéndose en un crecimiento más acelerado y una condición fisiológica similar al de las plantas en suelo. Una vez que se logre el enraizamiento *in vitro*, posiblemente el traspaso a condiciones *ex vitro* sea más fácil, logrando porcentajes altos de sobrevivencia, por el mejor estado fisiológico de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos.

## CONCLUSIONES

- Se pudo demostrar que el tejido haploide es susceptible al cultivo *in vitro*, sobre todo a partir de tejidos inmaduros, cultivado en medio Litz en oscuridad.
- A partir de megagametofitos de *P. chihuahuana* se pudieron establecer cultivos de callo que mostraron desarrollo de células transparentes, hialinas y alargadas que se asemejaron a las etapas iniciales de embriogénesis somática en otras especies de coníferas. De hecho se logró el desarrollo de una estructura organizada semejante a una hoja.
- La respuesta de los embriones inmaduros al cultivo *in vitro* está mediada por los reguladores del crecimiento y en gran medida por el medio de cultivo empleado,
- La mayor formación y posterior desarrollo de los brotes se obtuvo empleando kinetina con bajas o nulas concentraciones de 2,4-D.
- La mejor condición encontrada para la formación de brotes adventicios fue con medio SH adicionado con 5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina.
- El crecimiento de los brotes adventicios se vio favorecido con la reducción de la sacarosa en el medio de desarrollo (SH50%), de 15 a 10 g l<sup>-1</sup> y se logró la consolidación de un mayor número de brotes por embrión, así como un crecimiento a una tasa más elevada.

- La mayoría de los cultivos *in vitro* de embriones inmaduros en oscuridad desarrollaron únicamente callo y los pocos brotes que se formaron se oxidaron al pasarlos a condiciones de luz.
- Mediante la adición de ácido ascórbico y ácido cítrico al medio de cultivo y con baños de los explantes en una solución conteniendo ambos ácidos, se logró disminuir y/o evitar la oxidación.
- Se pudo establecer que existe una respuesta diferencial en el número de brotes formados por embrión, dependiendo de la localidad de procedencia de las semillas.
- El enraizamiento fue errático y sólo se logró en tres ocasiones.
- La disminución del contenido de sacarosa en el medio de desarrollo y elongación favoreció el crecimiento de los brotes adventicios.
- El subcultivo a SH10 permitió que los brotes incrementaran la fijación de CO<sub>2</sub>.
- Se encontraron mayores concentraciones de clorofilas en los brotes adventicios subcultivados en el medio SH10 que en aquellos provenientes de los medios SHK y SH15.
- Los valores de la actividad de las enzimas invertasas y peroxidases reafirmaron que el subcultivar brotes adventicios en medio SH10 promueve un mejor desarrollo fisiológico de ellos.

## APÉNDICES

### 1) Medio Litz

- Macronutrientes del B5	mg l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
KNO <sub>3</sub>	2500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	150
<b>- Micronutrientes del MS</b>	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
(MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	16.89
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>- Compuestos orgánicos del MS</b>	
Vitaminas	
Myo-inositol	100.0
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl(B6)	0.5
Tiamina-HCl (B1)	0.1
Aminoácido	
Glicina	2.0
<b>-Otros compuestos orgánicos</b>	
L-Glutamina	400

Hidrolizado Enzimático de Caseína	100
L-Asparagina	100
L-Arginina	100
L-Acido Ascórbico	100
Sacarosa	60 g l <sup>-1</sup>
pH	5.8
Bacto-Agar	8-9 g l <sup>-1</sup>

## 2) Medio Schenk y Hildebrandt (SH)

<b>- Macronutrientes</b>	<b>mg/l</b>
KNO <sub>3</sub>	2500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200
<b>- Micronutrientes</b>	
KI	1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	
(MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2
Na <sub>2</sub> EDTA	20.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0
<b>- Compuestos orgánicos</b>	
Vitaminas	
Myo-Inositol	50
Tiamina HCl (B1)	5

Ac. Nicotínico	5
Piridoxina HCl (B6)	0.5
Sacarosa	30 g l <sup>-1</sup>
pH	5.8
Agar-Agar	5.5 g l <sup>-1</sup>
o Bacto-Agar	8.5 g l <sup>-1</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B., Dunn, L.J., Morgens, P.H., Callahan, A.H., Dinterman, R.E. and Schmitt, J. 1988. Induction of 33-kDa and 60-kDa peroxidase during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 87:609-615.
- Ahuja, M.R. 1993. Micropropagation *à la carte* In: M.R. Ahuja (ed.). *Micropropagation of woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 3-9.
- Attree, S.M. and Fowke, L.C. 1991. 1.4 Micropropagation Through Somatic Embryogenesis in Conifers. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and Forestry, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 423:445.
- Attree, S.M., Dunstan, D.I. and Fowke, L.C. 1991. White spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] and Black spruce [*Picea mariana* (Mill) B.S.P.]. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 423-445.
- Attree, S.M. and Fowke, L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35:1-35.
- Ball, E. 1950. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 14:295-325
- Bergmann, B.A. and Stomp, A.M. 1994. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro*-produced shoots of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 39: 195-202.
- Bonga, J. 1983. *In vitro* propagation of conifers. In: L. Zuffa, R.M. Rauter, C.W. Yeatman (eds.). *Clonal forestry: its impact on forest tree improvement and our future forests*. Toronto: Canadian Tree Improvement Association, Proceedings of the 19th Meeting part 2. pp. 75-83.
- Bonga, J.M. 1981. Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In Vitro* 17:511-518.
- Bonga J.M. and von Aderkas, P. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer academic publishers, Netherlands. 236 p.

- Budimir, S. and Vujicic, R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pancic) Purk. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 31: 89-94.
- Bueschner, R.M., Sistrunk, W.A. and Brady, P.L. 1975. Effects of ethylene on metabolic and quality attributes in sweet potato rotos. J. Food Sci., 40:1018-1020.
- Capellades M.Q., Lemeur, R. and Debergh, P.C. 1991, Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 25:287-292.
- Capuana, M. and Giannini, R. 1997. Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). Journal of Horticultural Science, 72(3): 453-460.
- Čatský, J., J. Paopíšilová, J. Solárová, H. Synková and N. Wilhelmová. 1995. Limitations on photosynthesis under environment-simulating culture *in vitro*. Biologia Plantarum, 37 (1): 35-48.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro, CONABIO, México. p 847.
- Chaparro-Gómez, C.S. 1992. Factibilidad de la propagación *in vitro* de *Picea chihuahuana*. Tesis de Ingeniero Agrónomo Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Delicias, 99 p.
- Chávez, V. M., Litz, R. E., and Norstog, K. 1992a. *In vitro* Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 30:93-98.
- Chávez, V. M., Litz, R. E., and Norstog, K. 1992b. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:99-105.
- Christianson, M. and Warnick, D. 1985. Temporal requirements for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. Developm. Biol. 112:1-4.
- Coombs, J., Hall, J., Long S. and Scurlock P. 1988. Técnicas en fotosíntesis y bioproductividad. Edit. Futura, S.A. México. p 258.
- Cournac, L. Dimon, B. Carrier, P. Lohou, A. and Chagvardieff, P. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. Plant Physiol. 97:112-117.

- De Luca, P. and Sabato, S. 1980. Regeneration of coralloid roots on cycad megagametophytes. *Plant Science Letters*. 18: 27-31.
- De Luca, P., Sabato, S., Balduzzi, A. and Nazzaro, R. 1980. Coralloid root regeneration on *Macrozamia megagametophytes*. *Giorn. Bot. Ital.* 114: 271-275.
- Deg, R. and Donnelly, D.J. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry by CO<sub>2</sub> enrichment and reduced medium sucrose concentration. *HortScience*. 28:1048-1051.
- Desjardines Y. 1995. Factors affecting CO<sub>2</sub> fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 1:13-25.
- Donnelly, D.J., Vidaver, W.E. and Lee, K.Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 4:43-50
- Drake, P.M.W., John, A., Power, J.B. and Davey, M.R. 1997. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Stica spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) and high frequency *in vitro* rotting shoots. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 50: 147-151.
- Edelman, J. and A.D. Hanson. 1972. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot-tissue cultures. *J. Exp. Bot.* 75: 469-478.
- Ellis, D.D. and Bilderback, D.E. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, 76:348-355.
- Fay, M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. 3:176-187.
- Gahagan, H.E., Holm, R.E. and Abeles, F.B.1968. Effects of ethylene on peroxidase activity. *Physiol. Plant.* 21:1270-1279.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- García-Ferríz, L., Serrano, L. and Pardos, J.A. 1994. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcutting production in stone pine. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 36: 135-140.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd. England. 550 p.

- George, F.W. and Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstoke, England. 709 p.
- Gladfelter, H.J. and Phillips, G.C. 1987. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. *in vitro*. I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. Plant Cell Reports. 6:163-166.
- Go, N.E., Glorina, D., Perez-Orozco and Halos S.C. 1993. *In vitro* response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Morelet. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 32:1-7.
- Grout, B.W.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and stresses of transplanting. Acta Hortic. 230: 129-135.
- Grout, B.W.W. and Ashton, M.J. 1978. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. Hort. Res., 17:65-71.
- Grout, B.W.W. and Donkin, M.E. 1987, Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. Acta Hortic. 212:323-327.
- Harry, I.S. and Thorpe, T.A. 1994. Regeneration of Plantlets through organogenesis from mature embryos of Jack Pine. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 37: 159-164
- Harry, I.S., Martínez, C. and Thorpe, T.A. 1995. Plantlet regeneration from mature embryos of *Juniperus cedrus*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 41: 75-78.
- Hdider, C. and Desjardines, Y. 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. Plant Cell Tiss, and Org. Cult., 36:27-33.
- Heywood. V. H. 1992. Efforts to conserve tropical plants - A global Perspective. In: R.P. Adams and J.E. Adams (eds.). Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology, Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 1-14.
- Horton, R.F. 1993. Peroxidase ethylene and submergence-promoted growth of petioles of *Ranunculus sceleratus* L. J. Plant Physiol., 141:690-693
- Jacob, C.V. 1994. Estudio isoenzimático de la variación genética en poblaciones naturales de *Picea chihuahuana*, en los Estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León. Tesis de Licenciatura, ENEP Iztacala, UNAM, México. 114 p.

- Kolevska-Pletikapić, B. and Buturović-Derić, Z. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plant via organogenesis. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 41: 189-192.
- Kozai, T, Ch. Kubota and Jeong, B.R. 1997. Environmental control for the large-scale productions of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 51: 49-56.
- Kozai, T., Y. Koyama and Watanabe, I. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hortic.* 230: 121-127
- Langford, P.J. and Wainwright, H. 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.* 60:633-610.
- LaRosa P.C, Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1984. Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth, *Physiol. Plant.* 61: 279-286.
- Ledig, T.F., Jacob-Cervantes, V., Hodgskiss, P.D. and Eguluz-Piedra, T. 1997. Recent evolution and divergence among populations of rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution.* 51(6):1815-1827.
- Lee N., y. H. Wetzstein and Sommer, H.E. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplasts ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* 78: 637-641.
- Lees, R.P., Evans, E.H. y Nicholas, J.R. 1991. Photosynthesis in *Clematis* "The President" during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. *J. Exp. Bot.* 42:605-610.
- Litz, R. E., Hendrix, R. C., Moon, P. A. y Chávez, V. M. 1998. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 53(1):13-18.
- Litz, R.E., Moon, P.A. and Chávez, V.M. 1995. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 40:25-31.
- MacAdam, J.W., Nelson, C.I. y Sharp, R.E. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.* 99:872-878.

- Martínez, M. 1948. *Picea chihuahuana*, An, Inst, de Biol. Mex. 19(2):393-405.
- Martínez, P.C., Harry, I.S. y Thorpe, T.A. 1994. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 39:225-230.
- Mohammed G.H. y W.E. Vidaver. 1988. Root production and plantlet development in tissue-culture conifers. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 14:136-160.
- Narave, F. H. y Taylor, K. 1997. Flora de Veracruz, Pinaceae, fascículo 98, Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. 50 p.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial (16 de mayo de 1994).1994:2-25.
- Patel, K.R. and Thorpe, T.A. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of Lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.). Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 3:131-142.
- Prasad, T.K. and Cline, M.G. 1987. Shoot inversión inhibition of stem elongation in *Pharbitis nil*: a possible role for ethylene-induced glycoprotein and lignin. Plant Physiol. 85:104-108
- Retig, N. and Rudich, J. 1972. Peroxidase and IAA oxidase activity and isozyme patterns in cucumber plants, as affected sex expresión and ethephon. Plant Physiol. 27:156-160.
- Ridge, I. and Osborne, D.J. 1970. Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum sativum*: requirements for protein and RNA synthesis. J. Exp. Bot. 21:720-734.
- Roa, A.N. and Lee, S.K. 1982. Importance of tissue culture in tree propagation. Proc. 5<sup>th</sup>. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture. p. 715
- Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the fanerogmic flora of Mexico. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds.). Biological diversity of Mexico: Origins and distribution. Oxford University Press. Nueva York. pp. 129-144.
- Sánchez, M, G. Revilla e Zarra, I. 1995. Changes in Peroxidase Activity Associated With Cell Walls During Pine Hypocotyl Growth. Ann. of Bot. 75: 415-419.

- Sankhla, N., Sankhla, D. and Chatterji, U.N. 1967. *In vitro* induction of proliferation in female gametophytic tissue of *Ephedra foliata* Boiss. *Naturwissenschaften* 54, 203.
- SARH. 1993. Apoyos bibliográficos sobre plagas y enfermedades forestales, Anexo 3. pp. 96-97. Manual Normativo de Sanidad Forestal, Tomo II. Dirección general de protección forestal, Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre, Junio 1993.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Schuller, A., Reuther, G. and Geier, T. 1989. Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies alba*. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 17: 53-58.
- Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J. AND Araus, L. 1996. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tiss. And Org. Cult.* 45:1-16.
- Simola, L.K., Lemmetyinen, J. and Santanen, A. 1992. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 84: 374-379
- Singh, M.N., Konar, R.N. and Bhatnagar, S.P. 1981. Haploid Plantlet Formation from Female Gametophytes of *Ephedra foliata* Boiss. *in vitro*. *Ann. of Bot.* 215-220.
- Sommer, H.E. and Brown, C.L. 1977. Application of Tissue Culture to Forest Tree Improvement. In: W.P., Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock and V. Raghavan (eds.). Ohio State University Press, Colombus. pp. 461-491.
- Stepan, S.G. and Grey D. 1990. Growth determination and medium analysis. In: J.W. Pollard and J.M. Walker (ed.). *Methods in Molecular Biology*, vol 6, Plant Cell and Tissue Culture, Human press, New Jersey. pp.13-28.
- Sterner, B.A. and Hammerschmidt, R. 1985. The induction of disease resistance by heat shock. In: *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. 22:291-302.
- Thompson M.R. and Thorpe, T. 1987. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 1, General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 89-112.

- Thorpe T.A. and Harry, I.S. 1991. Clonal propagation of conifers. Plant Tissue Culture Manual C3: 1-16,
- Thorpe, T.A., Harry, I.S. and Kumar, P.P. 1990. Application of micropropagation to forestry. In: P., Debergh and R.H., Zimmerman (eds.). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 311-336.
- Tichá I., Čap, F., Pacovská, D., Hofman, P., Haisel, D., Čapková V. and Schäfer, C. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 102: 155-162.
- Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo XIV(81):17-30.*
- Toledo, V.M. and Ordoñez, Ma. De J. 1993. The biodiversity scenario of México: A review of terrestrial habitats. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds.). *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution.* Oxford University Press. Nueva York. pp. 757-777.
- Triques, K., Rival, A., Beulé, T., Puard, M., Roy, J., Nato, A., Lavergne, D., Havaux, M., Verdeil, J-L., Sangare, A., and S. Hamon. 1997. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. *Plant Science.* 127: 39-51.
- Tse-Min, L. and Yaw-Huei, L. 1995. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Science.* 106, 1-7.
- Van Huylbroeck J.M. and J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropopagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. *Plant Science.* 111: 19-25.
- Van Huylbroeck J.M. and P.C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plantarum.* 96: 298-304
- Van Huystee, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:165-168.
- van Loon, L.C. and Antoniw, J.F. 1982. Comparasion of the affects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Net. J. Plant Pathol.* 88:237-256.
- Villalobos, V.M., Yeung, C. and Thorpe, T.A. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons culture *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63:2172-2176.

- von Aderkas P. and Bonga, J.M. 1988. Morphological definition of phenocritical period for initiation of haploid embryogenic tissue from explants of *Larix decidua*. In: M.R. Ahuja (ed.). Somatic Cell Genetics of Woody Plants, Kluwer academic publishers, Dordrecht. pp. 29-38.
- von Aderkas P. and Dawkins, M.D. 1993. Haploid embryogenesis in trees. In: M.R. Ahuja (ed.). Micropopagation of Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 57-65.
- von Arnold, S. 1982. Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Sci. Lett.*, 27:275-287.
- von Arnold, S. and Eriksson, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J Bot.*, 59:870-874.
- Zheng, X. and Van Huystee, R.B. 1992. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Sci.*, 81:47-56.