

00381  
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ORGANOGENESIS *in vitro* ADQUISICIÓN DE LA COMPETENCIA  
MORFOGENÉTICA A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS DE *Picea*  
*chihuahuana* Martínez (Gymnospermae), ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A:

ANA LAURA LOPEZ ESCAMILLA

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

MEXICO, D. F.

285/66

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.

Con mucho cariño a:

Mis padres:

Gertrudis Escamilla Alcocer y Reynaldo López Camacho.

Por haberme dado siempre su apoyo para alcanzar mis metas.

Donde quiera que estén.... Gracias.

Nunca los olvido.

A mi hermano

Reynaldo López Escamilla.

A mis abuelos:

Gertrudis y Faustino; Elvira y Reynaldo

Aunque todos ellos ya no están conmigo, me dejaron lecciones de tenacidad, honestidad, lealtad, coraje, dedicación, cariño y entrega a toda tarea que he decidido emprender en la vida.

Por todas sus enseñanzas.

Muchas gracias.

A mi hermana Elsa Cecilia, por todas sus lecciones de fotografía que desde niña he recibido.

A Laura Patricia Olguín Santos y a su familia, por todo el apoyo y cariño que he recibido de ellos.

## PRÓLOGO

La conjunción de las técnicas de cultivo de tejidos con otras disciplinas permite adentrarnos y explorar la infinidad de procesos biológicos que se presentan en las plantas y tratar de dar una cercana explicación de ellos.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM, se han llevado a cabo diversos trabajos con la finalidad de conservar valioso germoplasma de especies mexicanas en peligro de extinción. En algunas ocasiones no es posible contar con suficiente material vegetal y además en buenas condiciones para iniciar los cultivos, lograr su micropropagación y llegar a establecer las plantas obtenidas en condiciones *ex vitro*, que ya por sí misma es una gran labor. Esta limitante con el material vegetal no da a veces la oportunidad de explorar otras áreas de la biología que podrían abarcar desde la biología molecular hasta el contexto ecológico de las especies a estudiar.

El presente trabajo de investigación es un esfuerzo para conjuntar algunas disciplinas y dar explicación a procesos que se presentan en los tejidos *in vitro*, dando particular énfasis a lo que se denomina competencia morfogénica, es decir la capacidad de los tejidos para responder a estímulos físico-químicos que den como resultado la obtención de regenerantes. Es importante señalar que la especie del presente estudio posee características evolutivas y ecológicas particulares que definitivamente se reflejan en las respuestas morfogénicas.

El trabajo está estructurado en cinco capítulos. Comienza con una introducción sobre la problemática de la especie, su importancia y las alternativas que se están llevando a cabo para su conservación *in situ* y *ex situ*. En los siguientes capítulos se analizó la capacidad morfogénica de los explantes utilizados (embriones de semillas maduras) y las estrategias utilizadas para obtener brotes adventicios, lograr su desarrollo a etapas posteriores, disminuyendo el severo problema de la oxidación y necrosis de los tejidos, para finalmente generar brotes y realizar ensayos para su enraizamiento. El desarrollo de las estructuras *de novo* que se presentan durante la competencia morfogénica y la influencia del medio de cultivo en la integridad del tejido se analizaron con técnicas histológicas que permitieron observar agrupaciones celulares previas a la formación de los brotes, así mismo fue posible explorar, aún con las limitantes del material biológico, la presencia de proteínas totales en los mejores tratamientos y en los tiempos de exposición más significativos donde se manifestó la mayor capacidad morfogénica de los explantes.

La conjunción de estos resultados permite plantear nuevas estrategias para la conservación de ésta y otras especies forestales que se encuentren en una situación similar y requieran del apoyo de las técnicas *in vitro* para la conservación de su germoplasma.

Sea así, con el mejor deseo de que la presente investigación abra nuevas inquietudes para continuar en esta ardua tarea de explorar, conocer, valorar y aprovechar racionalmente los recursos naturales de nuestro país.

Ana Laura.

## AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero manifestar mi gratitud a todos aquellos que han participado directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo, no quisiera omitir a alguien y si es así pido disculpas anticipadas.

Reitero mi agradecimiento al *Jardín Botánico* del Instituto de Biología de la UNAM por proporcionarme las facilidades para hacer uso de sus instalaciones, al *Dr. Robert Bye Boettler* por el apoyo que siempre me ha brindado; a la *Dra. Margarita Collazo Ortega* por su invaluable y firme presencia a lo largo de todos mis estudios; a la *Dra. Judith Márquez Guzmán* por su constante apoyo y permitirme hacer uso del equipo y materiales del Laboratorio del Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM; al *Dr. Roberto Arreguín Espinosa* por dedicar parte de su tiempo en instruirme en las técnicas que se aplicaron en este trabajo y por las facilidades para llevarlas a cabo en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM; al *M. en C. Alejandro Martínez Mena* del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, por la toma de las microfotografías de las preparaciones histológicas; a la *Asociación Civil Bosque Modelo* por su apoyo económico y el envío de información y de las semillas maduras de *Picea chihuahuana*; a la *Dra. Patricia Castillo España*, *Dra. Alicia Brechu Franco* por sus acertadas sugerencias y correcciones al trabajo escrito y al *Dr. Víctor M. Chávez Ávila* por su dirección y comentarios a la presente investigación.

Agradezco a la *Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)* la beca otorgada para llevar a cabo los estudios de Doctorado; al *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA)* No. IN205194 y al *Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)* No. 3377 por el apoyo económico para la compra de materiales y reactivos.

Con gratitud a *Silvia Espinosa*, *Ricardo Wong*, *Sonia Vázquez*, *Guillermina Murguía*, *Citlali Núñez*, *Dra. Clara Esquivel*, *Dr. Guillermo Laguna* del Laboratorio del Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, por su constante asesoría y paciencia en el desarrollo de las técnicas histológicas.

Muchas gracias a mis compañeros y amigos del *Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico* por la diaria convivencia, las palabras de ánimo, los momentos de apoyo, las críticas constructivas que poco a poco fueron conformando este trabajo, así como por las buenas y las malas experiencias que hacen que las cosas tengan sentido. Con mucho cariño a: *Lourdes Valenzuela, Laura Miranda, Isaac Reyes, Marco Antonio García, Karina Duval, Alejandro Martínez, Miriam Ladd, Inés Vargas, Álvaro Namorado, Luz María Rangel, Martín Mata, Noemí Barrón, Elizabeth Arriaga, Verónica Cervantes, Mario Monroy, Luisa Rodríguez, Pilar Ortega,, Gema Galindo y Paty Olguín.*

PRÓLOGO	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
<b>CAPÍTULO I Características y problemática de <i>Picea chihuahuana</i></b>	
Introducción general	1
Estrategias para la conservación de la biodiversidad	3
El género <i>Picea</i>	5
El género <i>Picea</i> en México	5
Importancia del género <i>Picea</i> en México	6
Origen de <i>Picea chihuahuana</i>	7
Distribución en México de <i>Picea chihuahuana</i>	8
Importancia y problemática de <i>P. chihuahuana</i>	9
Alternativas para su conservación	11
Decremento de las poblaciones	14
Objetivos	16
Bibliografía	17
<b>CAPÍTULO II Competencia morfogénica</b>	
Introducción	20
Competencia morfogénica	21
Factores que influyen en la competencia	25
a) Genotipo	25
b) Medio ambiente	25
c) Factores dependientes del tejido	26
Competencia morfogénica en coníferas	27
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
Material biológico	30
Competencia morfogénica	30
Análisis estadístico	31
Resultados y discusión	32
Morfología	32

Formación de primordios de brote	35
Tratamientos con K/2,4-D	36
Tratamientos con BA/ANA	37
Análisis estadístico	39
Conclusiones	43
Bibliografía	44
<b>CAPITULO III Micropropagación de <i>Picea chihuahuana</i></b>	
Generalidades del cultivo de tejidos	46
Cultivo de tejidos en gimnospermas	47
Elongación de brotes axilares	48
Organogénesis	48
Embriogénesis somática	51
Reguladores del crecimiento	53
Desarrollo de brotes	54
Enraizamiento	56
Antecedentes de estudios realizados en el género <i>Picea</i>	58
Antecedentes de estudios realizados en <i>Picea chihuahuana</i>	59
Objetivos	60
Materiales y métodos	61
Inducción de brotes adventicios	61
Desarrollo de brotes adventicios	61
Individualización de brotes adventicios	62
Pruebas de enraizamiento	62
Análisis estadístico	63
Resultados y discusión	64
Respuestas morfogénicas	64
a) Embriones sin respuesta	64
b) Oxidación	65
c) Germinación	66
d) Formación de meristemoides	66
e) Formación de primordios de brote	66
f) Desarrollo de brotes adventicios	67
Desarrollo de brotes adventicios	68
Análisis estadístico	72



Individualización de brotes adventicios	75
Pruebas de enraizamiento	78
Conclusiones	81
Bibliografía	82
<b>CAPITULO IV Análisis estructural y bioquímico</b>	
Introducción	86
Estudio de la competencia morfogénica.	86
Competencia morfogénica y cambios histológicos	88
Competencia morfogénica y síntesis de proteínas	90
Competencia morfogénica y pruebas autoradiográficas	92
Competencia morfogénica y cambios en la cantidad y distribución de almidón, lípidos y otros compuestos	92
Objetivos	94
Materiales y métodos	95
Histología	95
Extracción de proteínas	95
Cuantificación de proteínas en espectros de absorción de 280 y 562 nm	96
Resultados y discusión	99
Histología e histoquímica	99
Determinación del peso molecular	106
Cuantificación de proteínas	106
Conclusiones	110
Bibliografía	111
<b>CAPITULO V Discusión general y perspectivas</b>	
Discusión general	114
Conclusiones	121
Bibliografía	122
Apéndice I Características morfológicas de <i>Picea chihuahuana</i>	124
Apéndice II Formulación de los medios de cultivo	125
Anexo 1 Voces del Bosque	127
Anexo 2 Folleto informativo " <i>Picea chihuahuana</i> un árbol que se nos va"	129

## ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido Indol -3-acético
AIB	Acido Indol butírico
ANA	Ácido naftalén acético
ANOVA	Análisis de Varianza
B5	Medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima, 1968
BA	N <sup>6</sup> -bencilaminopurina
BCA	Ácido bicinonínico
GD	Medio de cultivo Gresshof y Doy, 1972
INIF	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources
K	Kinetina
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962
PAS	Ácido Peryódico reactivo de Schiff
SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
SEDESOL	Secretaría de Desarrollo Social
SH	Medio de cultivo Schenk y Hildebrandt modificado por Reilly y Washer, 1977
SIG	Sistema de Información Geográfica
S-VR	Safranina Verde Rápido

## RESUMEN

Se cultivaron embriones cigóticos de *Picea chihuahuana* Martínez en medio B5 modificado (medio de inducción) suplementado con N<sup>6</sup>-benciladenina o kinetina, solo o en combinación con ácido naftalén acético y ácido 2,4-diclorofenoxiacético respectivamente en diferentes concentraciones y tiempos de inducción, para determinar el tiempo de mayor o menor competencia organogenética, inducir una alta frecuencia de brotes adventicios y definir histológicamente su origen y desarrollo.

El tiempo mínimo de inducción requerido para la formación de brotes fue de 14 días en kinetina y de 17 días en N<sup>6</sup>-benciladenina. Para promover el desarrollo de los brotes, los embriones se transfirieron después de cada tiempo de inducción a medio B5 modificado al 50% de sus componentes y sin reguladores del crecimiento (medio de proliferación) donde permanecieron 30 días; para promover la elongación de los brotes y evitar la oxidación de los mismos se transfirieron cada 15 días en medio Schenk y Hildebrandt a la mitad de su concentración y sin reguladores del crecimiento (medio de elongación). Se obtuvo un promedio de 5 a 7 brotes por embrión en kinetina y N<sup>6</sup>-benciladenina 3 y 5 mg·l<sup>-1</sup> en ausencia de auxinas. Se realizaron ensayos de enraizamiento con los brotes que alcanzaron de 10 a 20 mm de altura; se aplicaron pulsos con diferentes concentraciones de ácido indol butírico pero solo un brote generó raíz.

En las primeras etapas de desarrollo de los brotes los análisis histológicos mostraron agrupaciones de tres y cuatro células que fueron más evidentes al incrementarse el tiempo de inducción. Las observaciones histológicas realizadas permiten suponer que la kinetina promueve el desarrollo de estructuras organizadas previas a la formación de brotes adventicios en un tiempo más corto que la N<sup>6</sup>-benciladenina, las pruebas bioquímicas mostraron que la kinetina promueve una alta síntesis de proteínas totales durante la formación de brotes adventicios mayor que la N<sup>6</sup>-benciladenina.

Lo anterior permitió establecer el tipo de regulador de crecimiento, su concentración y los tiempos mínimo y óptimo de inducción para obtener un mayor número de brotes de esta especie en peligro de extinción.

## ABSTRACT

Zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martinez were cultivated on modified B5 medium (induction medium) supplemented with N<sup>6</sup>-benzyladenine or kinetin, alone or in combination with naftalen acetic acid and 2-4, dichlorophenoyacetic acid, at different concentrations and induction times. This procedure was carried out in order to determine the time of higher or lower organogenic competence, to induce a high frequency of adventitious buds and to histologically define its origin and development.

The minimum induction time required for bud formation was 14 days with kinetin and 17 days with N<sup>6</sup>-benzyladenine. To promote bud development, embryos were transferred after every induction time onto B5 modified medium with 50% of its components and without growth regulators (proliferation medium) where they stayed for 30 days. To stimulate bud elongation and avoid oxidation they were transferred every 15 days to Schenk and Hildebrandt medium at half its concentration with no growth regulators (elongation medium). An average of 5 to 7 buds per embryo was obtained with the best treatments and time induction: 3 and 5 mg·l<sup>-1</sup> kinetin and N<sup>6</sup>-benzyladenine in the absence of auxins. Rooting trials were performed on buds that reached from 10 to 20 mm height.

Pulses with different concentrations of indolebutyric acid were applied and only one bud developed a root. In the first stages of bud development histological analysis showed clusters of three to four cells that became more evident when induction time was increased. Histological observations suggest that kinetin promotes development of organized structures before formation of adventitious buds in a shorter time than N<sup>6</sup>-benzyladenine.

Biochemical observations indicated that kinetin promotes a higher synthesis of total proteins during formation of adventitious buds than N<sup>6</sup>-benzyladenine.

This study enabled us to establish the kind of growth regulator, its concentration and the minimal and optimal induction times to obtain the higher number of buds of this endangered species.

### *Introducción general*

De los ecosistemas existentes en el mundo, los bosques constituyen en general una importante fuente de riquezas y beneficios que comprenden desde la regulación del clima, el hábitat de diferentes especies así como la obtención de productos maderables y no maderables. Sin embargo, sus poblaciones se han visto mermadas por las altas tasas de deforestación a que han estado sujetas (Thorpe y Biondi, 1984; Carnis *et al.*, 1995).

El uso de la tierra difiere de región a región, en América Latina el establecimiento de ranchos ganaderos son la mayor causa de la deforestación de los bosques, en otras partes del mundo los bosques son talados para otros usos como la minería, la construcción de hidroeléctricas, cultivo de narcóticos y la urbanización. Latinoamérica poseía en 1980, 613 millones de hectáreas de bosque tropical húmedo (57% del total mundial), de este el 20% se localiza en Brasil, el 31% está distribuido en cuatro países: Bolivia, Colombia, Perú y Venezuela y solamente el 6% está en Centro América y las Islas del Caribe. Es importante destacar que más de la mitad de la deforestación anual de los bosques tropicales se da en América Latina (Grainer, 1993).

En nuestro país aproximadamente el 26% del territorio nacional (49.7 millones de hectáreas) está cubierto por densos bosques (Carnis *et al.*, 1995), pero se estima que 24 millones de hectáreas ya se encuentran perturbadas como resultado de su transformación en campos de cultivo (SARH, 1992 citado por Carnis *et al.*, 1995).

Para proteger los bosques y su diversidad el gobierno, a través de programas de conservación ha preservado relativamente bien 5 millones de hectáreas, de las cuales el 57% son bosques y selvas y el 34% bosques tropicales (Ordoñez, 1990 citado por Carnis *et al.*, 1995), desafortunadamente es en el suroeste de México donde se presenta la mayor tasa de deforestación. Dentro de las principales causas que han provocado la drástica disminución en su extensión se pueden señalar a los incendios, huracanes, la sobrepoblación, así como las frecuentes talas clandestinas que originan claros que rápidamente son ocupados por potreros, pastizales o para uso agrícola que no permiten la regeneración natural (Bye, 1995).

Ortega y Castillo (1996) señalan que en el año de 1971 el bosque mesófilo ocupaba 1, 716 110 hectáreas, es decir el 0.86% de la superficie del país y que en 1991 se registraron 142 371 hectáreas que

corresponde al 0.07% del territorio, esto quiere decir que en 20 años el área que ocupaba esta formación forestal se ha reducido a una tasa promedio de 78 687 hectáreas por año.

Diversos autores citados por Carnis *et al.* (1995), han reportado tasas anuales de deforestación en diferentes zonas del territorio nacional, entre los datos más significativos están los presentados en 1984 por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), dependencia gubernamental que realizó un estudio cerca de Palenque, Chiapas, entre 1974 a 1981 y estimaron que la tasa anual de deforestación fue del 12.4%, así mismo Dirzo y García (1992) reportaron que de 1976 a 1986 cerca de Los Tuxtlas, Veracruz, la tasa de deforestación anual fue del 4.3%.

Es evidente que el territorio nacional ha tenido un mal uso de sus recursos naturales y que debido a la acción del hombre y a las actividades agropecuarias la vegetación original casi ha desaparecido (Vázquez-Yanes y Batis, 1996).

Otra importante agrupación forestal son los bosques de pino-encino que constituyen el 21% del territorio nacional, éstos son ricos en plantas vasculares (24%) y poseen el 32% de flora endémica (Rzedowski, 1993). Se estima que mundialmente en estos bosques, las coníferas forman aproximadamente el 60% de las áreas y son dentro de las gimnospermas las más conocidas y económicamente importantes. Se han reportado 50 géneros y de 300 a 500 especies (Haynes, 1975 citado por Thorpe y Harry, 1991).

En los bosques de México estas gimnospermas constituyen un elemento importante en la vegetación, el género *Pinus* ocupa grandes extensiones de las sierras en el país y representan uno de los dos centros de riqueza en coníferas a nivel mundial y en el territorio nacional se localizan 49 de las 100 especies existentes (Styles, 1993).

En 1983, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIF) consideró que de 30 millones de hectáreas de bosque en el país, 21 millones son de bosques de coníferas en las que predominan las especies de pino (Styles, 1993).

### *Estrategias para la conservación de la biodiversidad*

Las dos grandes vías propuestas para la conservación de los recursos genéticos son *in situ* y *ex situ*. (Ford-Lloyd y Jacson, 1986; Heywood, 1992). La primera está encaminada a preservar el hábitat y las especies que contiene con la finalidad de proteger la diversidad genética y su dinámica dentro de las poblaciones (Heywood, 1992). Para ello, una estrategia a seguir es el establecimiento de reservas de la biósfera constituidas por una zona o un conjunto de zonas núcleo dedicadas a la conservación de los ecosistemas y su biodiversidad, donde la perturbación humana se reduce al mínimo. En ellas se pretende unir la función de conservación de la biodiversidad y del medio, con la búsqueda de alternativas de desarrollo que reconcilien la conservación con el uso sustentable de los recursos naturales (Halfiter, 1995).

Otro mecanismo es la denominada restauración ecológica que intenta revertir los daños causados al ambiente dirigiendo el sistema a través de una ruta de etapas sucesivas para que recupere en un tiempo relativamente corto la composición de las especies y las interrelaciones que tenía la comunidad original. Una forma para tratar de detener el proceso de deterioro del suelo es el establecer una nueva cobertura vegetal y si es necesario auxiliario con obras de ingeniería ambiental (Vázquez-Yanes y Batis, 1996; Martínez-Romero, 1996).

Los primeros intentos de reforestación en nuestro país se realizaron hace aproximadamente sesenta años y se llevaron a cabo con una profunda falta de conocimiento científico de la flora mexicana y con el entonces incipiente desarrollo de la ecología. Se emplearon exclusivamente árboles de crecimiento rápido que se adaptaban con facilidad a climas y suelos diversos (Vázquez-Yanes y Batis, 1996).

El árbol más utilizado ha sido el eucalipto (*Eucalyptus* spp.), especie exótica de origen Australiano y que es un elemento pobre para la restauración ecológica por el efecto negativo que ejerce en los lugares donde se siembra debido a que transforman desfavorablemente los ambientes de la flora y la fauna local. La alternativa más factible para subsanar el empleo de especies exóticas es utilizar especies herbáceas y leñosas nativas, con potencialidad de crecer en zonas alteradas y que posteriormente permitan el establecimiento de las condiciones similares a la original (Vázquez-Yanes y Batis, 1996).

La conservación *ex situ* comprende el establecimiento de jardines botánicos y arboreta donde se concentran especies de cierta localidad o que provengan de diferentes partes de un país o países, el cultivo de especies de interés comercial u ornamental en viveros y la formación de bancos genéticos donde se puede almacenar polen o semillas ortodoxas, éstas son semillas que conservan su viabilidad después de ser deshidratadas y almacenadas a bajas temperaturas (-18°C, -20°C) prolongando su longevidad (Bass, 1984; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Towill y Ross, 1989). El almacenamiento de semillas ha resultado ser el procedimiento más económico y el que mejor garantiza la preservación de la identidad genética (Braun, 1988).

En el caso de las especies que producen semillas de tipo recalcitrante, que se caracterizan por ser de vida corta y sobrevivir solo algunas semanas o meses por su sensibilidad a la desecación y su alto contenido de humedad, requieren de otras estrategias para conservar su germoplasma la más común es almacenar sus partes vegetativas (tubérculos, rizomas, bulbos, esquejes), que serán utilizadas como "semillas" para generar nuevos individuos (Henshaw *et al.*, 1985; Wilkins y Dodds, 1983).

Esto ha propiciado que la aplicación de las técnicas *in vitro* tomen importancia para almacenar germoplasma de especies con semillas recalcitrantes o de difícil propagación y para conformar bancos de germoplasma *in vitro* (Bajaj, 1979; Withers, 1980; Wilkins y Dodds, 1983; Grout, 1991), que aunadas a las técnicas de crioconservación constituyen una vía posible para conservar el germoplasma por tiempos prolongados (Kantha, 1985; López-Escamilla, 1995).

Existen en nuestro país especies vegetales de las cuales desconocemos su gran potencialidad medicinal, farmacéutica, comercial así como su importancia económica y/o ecológica. Muchas de estas especies han desaparecido y otras más están amenazadas o en peligro de desaparecer, por lo que es importante plantear estrategias que nos permitan conservar y preservar su germoplasma. Entre esta gran cantidad de especies que se encuentran en peligro de extinción está un miembro del género *Picea*, objeto de estudio en la presente investigación.



### *El género Picea*

Las especies del género *Picea*, conocidos como pinoabetos, son un grupo que contribuye a la economía de varias regiones del norte del Continente Americano y son considerados entre los más importantes en el mundo (Gordon, 1968).

Son árboles siempre verdes, de ramas extendidas y generalmente verticiladas, sus hojas son más o menos rígidas y cuadrangulares con estomas en las cuatro caras, en algunas especies en dos de las caras y están dispuestos en espiral orientados en todas direcciones. Son plantas monoicas, los conos masculinos constan de numerosas anteras con dos sacos polínicos colocados en espiral, están conformados por numerosas escamas delgadas arregladas en espiral en torno a un eje.

Los conos femeninos portan las semillas, dos en cada escama y están provistas de un ala; la propagación es anemófila y no resisten la sequía ni el calor. Muchas especies son de valor ornamental por su porte elegante, realizado en la primavera por los conos masculinos que tienen un intenso color rojo brillante (Martínez, 1948).

Rehder (1935, citado por Martínez 1948 y 1953) señaló 38 especies de *Picea* que habitan climas fríos, desde el círculo polar ártico hacia el sur, llegando de América hasta las montañas más elevadas de Nuevo México y Arizona, de éstas 7 se ubican en Estados Unidos y Canadá, 29 en Asia y 2 en Europa, no se incluyen las *Piceas* encontradas en México.

El número cromosómico del género es altamente consistente ( $2n = 24$ ) y rara vez se presentan poliploidías, lo que sugiere que las restricciones del cruzamiento interespecífico son debidas a desarmonías génicas y/o citoplásmicas así como divergencias estructurales (Taylor y Patterson, 1980).

### *El género Picea en México*

El género *Picea* forma parte de los bosques de coníferas que en México se distribuye en la Sierra Madre Occidental, una de las provincias morfotectónicas más grandes que abarca cerca de 289 000 Km<sup>2</sup>, 14.68% de la superficie del país (Ferrusquía, 1993; Bye, 1995). Se extiende desde Nayarit, justo al sur del trópico de Cáncer, a través del occidente de Durango, y noroeste a través de Chihuahua hacia Sonora,

terminando en el suroeste de Arizona. El promedio de elevación es de 2000 a 3000 m.s.n.m., donde el punto más alto se localiza en Durango a 3150 m.s.n.m. Su vegetación está dominada por bosques de pino-encino (Gordon, 1968; Rzedowski, 1978 citado por Bye, 1995).

Los bosques en las partes altas de la Sierra Madre Occidental comprenden varias especies de *Pinus*, *Quercus*, *Arbutus*, *Cupressus* y *Juniperus*; mientras que en las depresiones se encuentra *Picea* junto con otras coníferas de los géneros *Abies*, *Pseudotsuga*, estos ambientes son fríos, húmedos y no están expuestos a los vientos secos (Gordon, 1968, Bye, 1995).

### *Importancia del género Picea en México*

En nuestro país, las poblaciones de *Picea* son importantes porque aunque el género se ha localizado en Canadá y Estados Unidos, así como en Europa y Asia (Martínez, 1948), el esquema filogenético propuesto por Wright (1955, citado por Gordon, 1968) coloca a este género en una relación cercana con algunas especies del sur de Asia debido a que :

1) Este género en nuestro país es descendiente de las primeras poblaciones de *Picea*, que en el Mioceno temprano dominaron los bosques del sur de México, la presencia de polen de *Picea* en el sur de Veracruz hace 2.4 millones de años (Pleistoceno medio) sugiere que el clima continental de México se ha modificado y ha sufrido un calentamiento (Graham, 1993; Bye, 1995) ;

2) El decremento de los abetos en México y su retiro al Norte coincide con el periodo de calentamiento global que finalizó en el Pleistoceno por lo que el género sufrió una reducción en su distribución hace casi 100,000 años (Gordon, 1968; Ledig *et al.*, 1997) ;

3) Por lo tanto *Picea* spp. en nuestro país es considerado un relictos de aquellas poblaciones.

Actualmente crecen tres especies de pinoabeto en el norte de México *Picea martinezii* Patterson, *Picea engelmannii* Parry var. *Mexicana* (Martínez) R.J Taylor and T. F. Patterson. y *Picea chihuahuana* Martínez.

*Picea martinezii* Patterson es un relictos endémico de la Sierra Madre Oriental que se extiende en las montañas desde el noroeste al suroeste de México. Se considera más probable que el polen encontrado en

lignitas del suroeste de México hayan procedido de esta especie que de las otras dos especies de pinabete (Graham, 1975, citado por Patterson, 1988; Taylor *et al.*, 1994; Bye, 1995).

*Picea engelmannii* Carr. que ha sido descrita también como *Picea mexicana* Martínez, es una especie subalpina que se encuentra por arriba de los 3 400 m.s.n.m. en las montañas de Coahuila y Nuevo León, fue descrita por Martínez en 1961, (Taylor *et al.*, 1994; Bye, 1995). Debido a sus características fenotípicas con *Picea engelmannii* Carr. En 1994 Taylor y colaboradores realizaron estudios taxonómicos y observaron que las diferencias entre ambas no son suficientes para justificar su separación en dos especies distintas y por conveniencia taxonómica los autores propusieron que *P. mexicana* sea mantenida a nivel de variedad y lo correcto es denominar *P. engelmannii* Parry var. *mexicana* (Martínez) R.J Taylor and T. F. Patterson.

*Picea chihuahuana* fue descrita por Maximino Martínez en 1942 (Martínez, 1948), sus poblaciones se localizan sólo en el norte del país, específicamente en Chihuahua y Durango (Patterson, 1988; Taylor y Patterson, 1980), a mostrado ser una especie distintiva que se presume derivó independientemente de sus antecesores de Asia (Taylor *et al.*, 1994), habita lugares sombríos y húmedos entre 2350 a 3200 m.s.n.m. y su nombre común es "pinabete" o pino espinoso (Apéndice I).

#### *Origen de Picea chihuahuana*

Su taxonomía y clasificación sugieren dos explicaciones de su origen. Al parecer fue en el Cretácico, en las orillas de masas de tierra en la parte del Pacífico de pre-norte América o posiblemente en el Jurásico temprano antes de una masiva expansión de angiospermas en los bosques, tal como lo evidencian los restos fósiles de *Picea* y otros géneros de bosque templado del Cretácico encontrados en el suroeste de los Estados Unidos (Gordon, 1968). Otra posibilidad es que *P. chihuahuana*, o sus antecesores, entraron a Norte América cuando había un libre intercambio entre Asia y Norte América en el Terciario temprano y avanzaron al sur después del Eoceno durante la glaciación del Mioceno.

Generalmente muchas especies de *Picea* se establecieron durante o antes del Pleistoceno, *Picea*, más probablemente *P. chihuahuana*, fue un componente aparentemente regular pero no abundante de los bosques

Mexicanos del Plioceno. Se han encontrado registros de *Picea* spp. tanto en el Eoceno y Oligoceno en la Columbia Británica, como del Paleoceno en Montana y del Paleoceno y Eoceno en Alaska.

Considerando las diferencias taxonómicas entre especies, *P. chihuahuana* pudo haber arribado a Norte América durante el Cretácico o en periodos tempranos, mientras que la *Picea* procedente de América entró posteriormente en el Terciario temprano o medio, aunque se ha establecido que fue en el Pleistoceno tardío (Gordon, 1968).

Wright 1955 (citado por Gordon, 1968), propuso un esquema filogenético de la especie y realizó una extrapolación de caracteres; observó que la afinidad morfológica de los conos de *P. chihuahuana* la une tanto con *P. breweriana* S. Wats, (especie de Norte América) con *P. abies* (L.) H. Karst (especie de Europa), más cercanamente con *P. polita* (Sieb. and Zucc.) Carr. y *P. maximowiczii* Reg. (especies del Japón) y con *P. brachytyla* (Franch.) Pritz. (de China). Lo que parece evidente es que *P. chihuahuana* no está emparentada con las especies del noroeste de América y probablemente arribó a Norte América en una etapa más temprana (Gordon, 1968).

#### *Distribución en México de Picea chihuahuana*

Cuando Martínez realizó la descripción de *Picea chihuahuana* en 1942 señaló algunas de sus poblaciones, localidades y altura de las zonas donde se realizaron las colectas y en otras no se especificó. La ubicación tanto en Chihuahua como en Durango fue la siguiente:

Arroyo de los Talayotes, Predio Tucheáchic a 32 Km de San Juanito, Municipio de Bocoyna, Chih., a 2350 m.s.n.m.

Arroyos de Urichique, El Cuervo y Meghuachic Municipio de Bocoyna, Chih.

Cituriáchic a 8 Km de San Juanito, Chih., a 2450 m.s.n.m.

Margen izquierdo del río Temochic, Municipio de Guerrero, Chih.

Cerro de La Cruz, a 500 metros de San Juanito, Chih., a 2400 m.s.n.m.

Reserva Nacional de Tutuaca, Municipio de Temosáchic, Chih.

El Vergel, Municipio de Balleza, casi en el límite entre los estados de Chihuahua y Durango a 2500 m.s.n.m.

Arroyo de Santa Bárbara, Pueblo Nuevo, Dgo.

Arroyos de Santa Bárbara y Hornitos.

Bosques de El Salto, Pueblo Nuevo Dgo. |

Sierra de la Candela, Tepehuanes, Dgo. |

Las localidades donde crece *P. chihuahuana* se encuentran entre los 2 220 y 2 600 m.s.n.m., en pendientes muy pronunciadas, con una temperatura media anual entre 8 y 12°C, con exposiciones hacia el norte y en lugares sombríos y húmedos (Sánchez y Cano, 1997). Se creía que *P. chihuahuana* existía en el estado de Nuevo León, pero Patterson en 1988, al comparar las poblaciones de *Picea* reportadas en dicho estado con las poblaciones ubicadas en Chihuahua y Durango, concluyó que estaban conformadas por una nueva especie que denominó *P. martinezii*.

#### *Importancia y problemática de P. chihuahuana*

*P. chihuahuana* (Fig. 1) es considerado un relictos endémico, actualmente sólo se conocen 26



Fig. 1. Árbol adulto de *Picea chihuahuana*

poblaciones que contienen aproximadamente 16,000 individuos. Su distribución se limita a los municipios de Bocoyna y Guerrero en Chihuahua, donde existen 14,000 individuos y al norte de Durango donde hay aproximadamente 2,000 individuos (Sánchez y Narváez, 1990 citado por Jacob, 1994; Bye, 1995; 1997; Sánchez y Cano, 1997).

Estas poblaciones están conformadas casi en su totalidad por individuos adultos que presentan serios problemas en su reproducción debido principalmente a la plaga de la palomilla *Cydia phyllisi* Miller que desarrolla parte de su ciclo de vida en los estróbilos femeninos.

La palomilla ovoposita sobre las escamas del cono femenino para posteriormente perforar estróbilos y semillas de las cuales se alimentan las larvas y anidan en el interior del cono (SARH, 1993), se calcula que

las larvas están presentes en un 85% de los conos y dañan 21% del total de las semillas viables (Fig. 2) (Narváez 1987, citado por Chaparro, 1992), lo cual no permite que se logren establecer individuos jóvenes en las poblaciones.

Otros elementos que contribuyen a la falta de regeneración de las poblaciones de *P. chihuahuana* son: las diversas actividades de las ardillas que destruyen los conos; el gran



Fig. 2. Semillas de *Picea chihuahuana*, perforadas (P) por las larvas de *Cydia phyllisi*. Escala = 3 mm.

número de conos que se desprenden antes de la maduración los cuales se tornan de color café oscuro y se pudren sin abrirse por las condiciones de alta humedad que prevalece en el terreno al final del verano e inicio del otoño (Gordon, 1968); la presencia de hongos Fomicetos de los géneros *Alternaria* y *Nigrospora*, probables causantes de la pudrición de la madera, que alteran su calidad (Sánchez y Narváez 1985 citado por Chaparro, 1992); las actividades antropogénicas como la tala clandestina para la obtención de vigas, el despunte de los árboles de menos de seis metros y la tala de individuos jóvenes para comercializar los árboles como ornato en la época navideña; las prolongadas sequías; los incendios forestales (3.5%) provocados por el hombre (Weisel. com. pers.); la presencia de puntas secas por causas desconocidas (3%) y puntas dañadas por los rayos (0.3%) (Chaparro, 1992).

Otro importante factor es una aparente pérdida en su agresividad regenerativa, la cual puede ser causada por la depauperización del biotipo como resultado de la restricción geográfica a que han sido sometidos por largo tiempo y a que está restringida a un hábitat especializado (Stebbins y Major, 1965, citados por Gordon, 1968).

Gordon (1968) señala varias razones por las cuales *P. chihuahuana* no podrá escapar de la extinción y estas son:

- 1) La especie está altamente especializada para el nicho ecológico que ahora ocupa la Sierra Madre Occidental;
- 2) No tiene un corredor continuo que la una con otras poblaciones, lo que trae como consecuencia una limitada carga genética;
- 3) Asimismo, la especie está extremadamente restringida a un rango que involucra solo unas pocas localidades con una amplia distribución espacial;
- 4) La pérdida de su agresividad regenerativa está ejemplificada por la baja tasa de regeneración de individuos ;
- 5) La recurrente posibilidad de intensos incendios, además de que la especie requiere de tiempos largos para alcanzar la madurez sexual.

Esto ha tenido como resultado que las poblaciones actuales estén conformadas principalmente por individuos adultos y por muy escasos individuos jóvenes. Todos estos factores son los que han colocado a esta especie en serio peligro de extinción tal como lo señalan SEDESOL en 1993 o como lo indica la lista de taxa arbóreas elaborada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) (Vera, 1990 citado por Ledig *et al.*,1997). Así mismo la IUCN la tiene calificada como especie amenazada (Ledig *et al.*,1997).

### *Alternativas para su conservación*

Actualmente el gobierno de Canadá está impulsando el desarrollo de programas en diferentes países para la conservación y uso sustentable de los bosques a través del Programa de Bosques Modelo, el cual incluye a diez bosques que están respaldados por el Programa de Asociados para el Desarrollo Sustentable de los Bosques.

En el estado de Chihuahua se está desarrollando el programa denominado Bosque Modelo Chihuahua, conformado por una asociación civil que cuenta con apoyo proporcionado por el gobierno de Canadá. Se localiza en el oeste y centro del estado de Chihuahua y la parte norte de la Sierra Madre, e incluye más de 47 000 has de bosque comercialmente productivo y tierras para la agricultura con pesca y caza a pequeña escala. Se están desarrollando proyectos que involucran el control de la contaminación, piscicultura, agricultura así como incrementar el turismo y recreación, los que se difunden a través de folletos informativos (Anexo 1).

Así mismo, la conservación del hábitat de *P. chihuahuana* por medio de su reforestación, protección y programas de educación e información para promover y dar a conocer el valor de esta especie (Anexo 2).

Este último proyecto, es uno de los primeros esfuerzos hechos en Chihuahua que aborda el problema de especies arbóreas en peligro de extinción.

Algunas de las poblaciones de *P. chihuahuana* en el área de influencia del proyecto y sus colindancias son: El Realito, Napahuichi 1 y 2, Situriachi, Las Águilas, Cerro de la Cruz, El Ranchito, La Tinaja, El Cuervo, Las Trojas, Talayotes, Vinihueachi, El Pinabetal, La Louisiana (Fig. 3), coincidiendo algunas de estas localidades con las señaladas por Martínez en 1948.





Se han llevado a cabo estudios dentro del área de influencia del programa, para localizar sitios con alto potencial para el establecimiento de plantaciones de *P. chihuahuana* que sirvan en un futuro para habilitar o restaurar su hábitat a través de actividades silviculturales. Esto fue posible compilando datos de campo y procesándolos por el sistema de información geográfica (SIG), para detectar las áreas donde la especie tendría posibilidades de desarrollarse (Sánchez y Cano, 1997).

Así mismo han evaluado las características fenotípicas de semillas procedentes de diferentes localidades, su capacidad de germinación, desarrollo y características de las plántulas (Ortega, 1997).

### *Decremento de las poblaciones*

Desafortunadamente, la disminución de esta especie por diversas causas es alarmante, tal como lo demuestran los datos proporcionados por Bosque Modelo Chihuahua en 1993, respecto al número de árboles vivos, la superficie que ocupan y la densidad de las poblaciones en distintas localidades de su área de influencia (Tabla 1).

Tabla 1. Número de árboles de *Picea chihuahuana* vivos (NAV), superficie y densidad (NAV/ha) que ocupan en las diferentes localidades del área de influencia del proyecto Bosque Modelo Chihuahua (1993)

Localidad	(NAV)	Superficie (Has)	Densidad NAV/ha
Napahuichi 1	1985	13.6	145.1
Napahuichi 2	359	2.1	170.9
Situriachi	675	286	175.7
Las Águilas	716	7.2	94.4
Cerro de la Cruz	85	1.1	33.3
El Ranchito	399	4.5	84.2
La Tinaja	136	1.1	116.2
El Cuervo	236	6.9	34.2
Las Trojas	1654	23.4	70.6
Talayotes	590	7.8	74.4
El Realito	797	5.4	147.5

Ledig y colaboradores en 1997 censaron algunas poblaciones de *P. chihuahuana* de las cuales sólo 4 coinciden con localidades del área de influencia de Bosque modelo (Tabla 2); la comparación de los datos permitió realizar una estimación del número de individuos que anualmente mueren, aunque no fue posible establecer las causas (Tabla 3).

Tabla 2. Algunas de las poblaciones de *Picea chihuahuana* censadas por Ledig *et al.*, 1997.

Localidad	NAV	Superficie (Has)	NAV/ha
Rio Vinihueachi	2441	45	54.2
Talayotes	377	7.8	48.3
Cerro de la Cruz	17	0.7	24.2
El Realito	587	5.4	108.7
La Tinaja	120	1.1	109
Arroyo Ancho	683	9.6	71.1

Tabla 3 Comparación de cuatro poblaciones censadas en 1993 por Bosque modelo y por Ledig en 1997. Se estimó el número de individuos que mueren anualmente.

Localidad	Bosque modelo 1993	Ledig <i>et al.</i> , 1997	No de individuos que mueren anualmente
Cerro de la Cruz	85	17	17
La Tinaja	136	120	4
Talayotes	590	377	53
El Realito	797	587	52

El decremento en los individuos de las poblaciones señaladas es considerable y alarmante. Al inicio de la presente investigación en 1993 se tenía una estimación de 17,000 individuos en las poblaciones comprendidas en el área de influencia de Bosque Modelo, en fechas recientes (1999) se ha estimado que hay 16,000 individuos, esto indica que la al año mueren 177 árboles.

Debido a su importancia evolutiva, por ser un relicto endémico, monitor del cambio climático, por su importancia ecológica y regional dentro de las comunidades indígenas y estar clasificada como especie en peligro de extinción, es necesario realizar estudios en *P. chihuahuana* que nos permitan proponer alternativas para promover su propagación y conservación. Es por ello que en la presente investigación se evaluaron aspectos sobre la capacidad de regeneración de *P. chihuahuana* Martínez (Pinaceae), por medio de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, histológicas y bioquímicas.

Para lograr lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

***Objetivo general:***

A partir de semillas maduras de *Picea chihuahuana*, obtener la regeneración de individuos y estudiar la competencia morfogénica de los explantes utilizados.

***Objetivos particulares:***

A partir de embriones cigóticos obtener brotes adventicios y/o embriones somáticos, promover su enraizamiento y desarrollo a plántula.

Estimar cual es el tiempo de exposición y concentración de auxinas/citocininas que requieren los explantes para generar la mayor cantidad de brotes o embriones.

Estudiar la capacidad morfogénica de las semillas maduras de los mejores tratamientos ensayados.

Evaluar estructural y bioquímicamente los cambios en los mejores tratamientos y tiempos ensayados que generen la mayor respuesta morfogénica.

Establecer en condiciones de invernadero las plántulas obtenidas, lograr su aclimatización y posteriormente en un futuro trasladarlas a las instalaciones de Bosque Modelo Chihuahua.

**Bibliografía**

- Bajaj YPS. 1979. Establishment of germplasm banks through freeze-storage of plant tissue culture and their implications in agriculture. *In: Sharp WR, Larsen PO, Paddock EF, Raghavan V, (eds.). Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications. Ohio State University, Columbus. pp 745-774.*
- Bass LN. 1984. Germplasm preservation. *In: Conservation of crop germplasm. An international perspective. CSSA. Special publication. No. 8 pp 55-67.*
- Braun A. 1988. Cryopreservation of sugarbeet germplasm. *Plant Cell Tissue Organ Culture. 14:161-168.*
- Bye R. 1995. Prominence of the Sierra Madre Occidental in the Biological Diversity of México. *In: Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago. General Technical Report RM-GTR-264. September 19-23, 1994. Tucson, Arizona. pp 19-27.*
- Bye R. 1997. A range full of treasures. *In: Ocelotl. Revista Mexicana de la conservación. PRONATURA. Número 6:18-23.*
- Carnis MA, Dirzo R, Zadroga F. 1995. Forests of Mexico. *Journal of Forestry Vol. 93. No. 7:21-24.*
- Chaparro G. 1992. Factibilidad de la propagación *in vitro* de *Picea chihuahuana*. Tesis de Ingeniero Agrónomo Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chihuahua. 99 p.
- Ferrusquía I. 1993. Geología de México: una sinopsis. *In: Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución. Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa. J (eds.), Instituto de Biología, UNAM, México. pp 3-108.*
- Ford-Lloyd B, Jackson M. 1986. Conservation. *In: Plant Genetic. Resources: An introduction to their conservation and use. Edward Arnold, Baltimore. pp 50-67.*
- Gordon AG. 1968. Ecology of *Picea chihuahuana* Martínez. *Ecology 49(5):880-896.*
- Graham A. 1993. Factores históricos de la diversidad biológica de México. *In: Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución. Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa. J (eds.), Instituto de Biología, UNAM, México. pp 109-127.*
- Grainger A. 1993. Controlling tropical deforestation. Earthscan Publications, London, 310 p.
- Grout BW. 1991. Conservation *in vitro*. *In: Maschepa JJ, Moncousin C (eds.) International Symposium on Plant Biotechnology and its contribution to the improvement, the multiplication and development of plants, Geneva, Switzerland. pp 171-178.*
- Halffter G. 1995. Reservas de la biósfera y conservación de la biodiversidad en el siglo XXI. *Revista Ciencias. UNAM, México. pp 9 -13.*
- Henshaw GG, O'hara J, Stamp J. 1985. Cryopreservation of potato meristems. *In: Kartha KK (ed.) Cryopreservation of plant cells and organs. CRC. Press. Inc. Boca Raton. pp 159-170.*
- Heywood VH. 1992. Efforts to conserve tropical plants -A global Perspective. *In: Adams RP, Adams JE (eds.). Conservation of Plant Genes. DNA Banking and in vitro Biotechnology. Academic Press. Inc San Diego, California. pp 1-14.*

- Jacob V. 1994. Estudio isoenzimático de la variación genética en poblaciones naturales de *Picea chihuahuana*, en los estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León. Tesis Licenciatura. Iztacala UNAM. México. 114 p.
- Kartha KK. 1985. Cryopreservation of plants cells and organs. Newsletter. International Association of Plant Tissue Culture. No.45:2-15.
- Ledig FT, Jacob-Cervantes V, Hodgskiss P, Eguluz-Piedra T. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare mexican endemic, Chihuahua spruce, following holocene climatic warming. *Evolution* 51(6):1815-1827.
- López-Escamilla A.L. 1995. Evaluación de la sobrevivencia *in vitro* de diferentes especies vegetales sometidas a temperaturas super-bajas. Tesis de Maestro en Ciencias (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 119 p.
- Martínez M. 1948. *Picea chihuahuana*. *Anal. del Inst. de Biol. Mex.* 19(2): 393-405.
- Martínez M. 1953. Las Pináceas Mexicanas. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Recursos y Caza, México. pp 7-19.
- Martínez-Romero E. 1996. La restauración Ecológica. *Revista Ciencias. UNAM. México.* Num 43:56-61 julio-septiembre..
- Ortega E, Castillo G. 1996. El bosque mesófilo de montaña y su importancia forestal. *Revista Ciencias. UNAM, México.* Num. 43: 32-39 julio-septiembre.
- Ortega C. 1997. Fase 2: Comportamiento de varias procedencias de *Picea chihuahuana* Martínez en San Juanito, Chih. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Cd. Madera Chihuahua. 20 p.
- Patterson T. 1988. A new species of *Picea* (Pinaceae) from Nuevo León, México. *SIDA* 13(2):131-135.
- Rzedowski J. 1993. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *In: Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución.* Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa. J (eds.), Instituto de Biología, UNAM, México. pp 129-145.
- Sánchez G, Cano M. 1997. Conservación y aprovechamiento del Pinabete. Fase 1. Detección de áreas potenciales para la propagación de *Picea chihuahuana*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias. Campo Experimental Cd. Madera, Chihuahua. 26 p.
- SARH. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre. 1993. Manual Normativo de Sanidad Forestal. Dirección General de Protección Forestal. Tomo II, Anexo 3:96-97.
- SEDESOL. 1993. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOMPA-CRN-001/93, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, raras, endémicas, amenazadas, en peligro de extinción y las sujetas a protección especial. *Diario Oficial*, lunes 2 de agosto de 1993 pp 12-40.
- Styles B. 1993. El género *Pinus*: su panorama en México. *In: Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución.* Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa. J (eds.), Instituto de Biología, UNAM, México. pp 397-420.

- Taylor R, Patterson TF. 1980. Biosystematics of Mexican spruce species and populations. *Taxon* 29(4):421-469.
- Taylor R, Patterson TF, Harrod RJ. 1994. Systematics of Mexican Spruce-Revisited. *Systematic Botany*. 19(1): 47-59.
- Thorpe TA, Biondi S. 1984. Fiber and Wood. *In: Handbook of plant cell culture*. Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y. (eds.). *Crop Species*, Vol 2 pp. 435-503. McMillan Publisher Company. New York.
- Thorpe TA, Harry IS. 1991. Clonal propagation on conifers. *Plant Tissue Culture Manual*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. C3 pp.1-6.
- Towill LE, Ross EE. 1989. Technique for preserving of plant germplasm. *In: Knutson L, Stoner AK (eds.). Biotic diversity and germplasm preservation. global imperatives.* pp 179-403.
- Vázquez- Yanes C, Batis AI. 1996. La restauración de la vegetación, árboles exóticos vs. árboles nativos. *Revista Ciencias UNAM, México*. Num. 43: 16-23 julio-septiembre.
- Withers L. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR. Technical Report, Rome. APG: IBPGR/80/8
- Wilkins W, Dodds J. 1983. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation *SCI, Prog, Oxf.* 68:259-284.

### *Introducción*

La propagación vegetativa de muchas coníferas está limitada por los cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración, la cual vuelve a los tejidos inmaduros, incapaces de responder a los estímulos organogénéticos externos (Ellis y Bilderback, 1989), por lo que uno de los mayores problemas de la morfogénesis vegetal es esclarecer los mecanismos por los cuales las células meristemáticas o parenquimatosas llegan a especializarse en distintos tipos celulares o tejidos en sucesivos estados de desarrollo. La morfogénesis puede estudiarse a diferentes niveles de organización (células, tejidos, órganos y plantas completas), por lo que es posible que existan distintos mecanismos que controlen cada nivel. El estudio de los problemas asociados con el crecimiento y diferenciación se pueden evaluar desde el punto de vista estructural, fisiológico, bioquímico y molecular (Thorpe y Kumar, 1993).

La organogénesis se puede estudiar empleando los métodos *in vitro* debido a que es factible manipular los explantes exponiéndolos a diferentes condiciones físico-químicas (Flinn *et al.*, 1988). Una de ellas es al proporcionar un apropiado periodo de inducción con reguladores del crecimiento, en el cual las células dentro del explante llegan a determinarse hacia un patrón específico de diferenciación. La determinación caulogénica puede ser evaluada por la habilidad de los explantes para producir brotes en ausencia del estímulo inicial (Christianson y Warnick, 1983 citados por Flinn *et al.*, 1988; Flinn *et al.*, 1988).

Para comprender estos procesos es necesario primero definir algunos conceptos. En las plantas hay muchos tipos de células que poseen diferentes formas, funciones y estructuras; éstas células especializadas se han denominado diferenciadas. La diferenciación ocurre cuando las células cesan de dividirse activamente y se vuelven quiescentes (George y Sherrington, 1984). Los órganos de plantas diferenciadas pueden usualmente crecer en cultivo sin perder su integridad. El crecimiento depende de la estructura que es cultivada y de la carga genética o "predeterminada" de las células que pueden ya haber recibido.

Los patrones de la expresión genética que son estables y heredables entre futuras generaciones de células vegetales son llamados epigenéticos. La determinación es un fenómeno epigenético, por consiguiente los órganos vegetales son de dos tipos: órganos determinados los cuales están destinados a tener solo una forma y tamaños definidos y órganos indeterminados donde el crecimiento es potencialmente ilimitado.



La determinación de las células usualmente se modifica al alterar las condiciones *in vitro* y en particular al cambiar las concentraciones de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Para que la morfogénesis sea posible, las células deben ser capaces de responder a los reguladores del crecimiento, esto es deben ser competentes (George, 1993).

### *Competencia morfogénica*

La competencia morfogénica ha sido definida como la habilidad del tejido para responder a la inducción morfogénica (organogénica o embriogénica), se da a lo largo de una vía particular que significa que las células pueden dirigirse hacia un desarrollo autónomo o alcanzarlo cuando reciben una señal apropiada, la cual puede ser ambiental o química (Ellis y Bilderback, 1989; Lyndon, 1990).

Thorpe y Kumar en 1993 señalaron que los eventos que se manifiestan en los procesos iniciales de la organogénesis de novo pueden dividirse en las siguientes fases: 1) obtención de la competencia o fase de pre-inducción; 2) inducción o determinación y 3) expresión o post-iniciación.

El alcanzar las células del explante la competencia morfogénica es comparable a la dediferenciación, esto quiere decir que se recobra la actividad meristemática de las células más o menos maduras a través del proceso inverso de la diferenciación de las células o tejidos. Dado que la diferenciación, se refiere a los cambios morfológicos y fisiológicos en células y tejidos de un desarrollo relativamente no especializado (indiferenciado) a uno más especializado, la dediferenciación serán los cambios morfológicos y fisiológicos donde las células con mayor o menor madurez recobran la actividad meristemática y alcanzan un estado competente.

Una vez que las células llegan a ser competentes o capaces de responder a la inducción morfogénica pueden ser inducidas a seguir una determinada vía morfogénica. La inducción está dada por estímulos externos como las fitohormonas en el medio de cultivo y/o el balance entre los niveles endógenos y exógenos de éstos.

Para comprender estas fases, Flinn *et al.* (1988) representaron gráficamente la secuencia general que se presenta durante el desarrollo de un explante competente hasta la formación de los brotes (Fig. 1).

Los autores explican que los explantes competentes (A) requieren de un tiempo mínimo de exposición en citocininas para obtener la formación de brotes, este periodo mínimo de inducción marca el inicio de la determinación (B). Una menor exposición a citocinina durante el periodo, el cual constituye la fase de predeterminación (C), no inducirá la formación de brotes. Con largas exposiciones de citocininas, se desarrollan más brotes, hasta que se obtiene una máxima respuesta (D), pero una prolongada exposición de citocininas no mejora la formación de brotes después de que la determinación ha ocurrido, las células determinadas continuarán su desarrollo hacia la fase de postdeterminación (E) y eventualmente se diferenciarán en brotes adventicios (F).

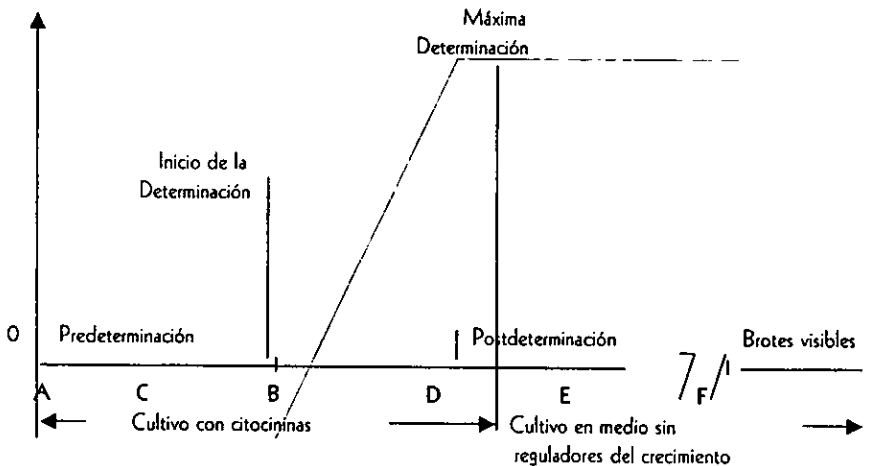


Fig. 1 Representación esquemática de la secuencia en el desarrollo de la formación de brotes. A, exposición inicial a citocininas; B, inicio de la determinación; C, fase de predeterminación; D, punto de máxima determinación; E, fase de postdeterminación; F, diferenciación de los brotes adventicios (tomado de Flinn *et al.*, 1988).

Lo anterior indica que la inducción de órganos requiere colocar el explante en un medio adecuado y en un tiempo determinado donde adquiere la capacidad de ser competente, en esta etapa no se induce la formación de brotes sino hasta que son transferidos los explantes a un medio carente de reguladores del crecimiento donde la inducción se da, posteriormente se promueve la determinación de los explantes y se manifiesta un desarrollo y diferenciación morfológica (Lyndon, 1990).

Otros factores que intervienen en la manifestación de la competencia morfogénica son: el origen, edad fisiológica y el tejido con el cual está asociado el explante (George y Sherrington, 1984), lo que permite que las células puedan ser capaces de:

contribuir a un continuo crecimiento organizado en un órgano en cultivo,

dar lugar a un nuevo tejido indiferenciado,

dar lugar a un tejido capaz de ser morfogénico.

El desarrollo de diferentes tipos de células, tejidos y órganos de un origen común implica que las células están competentes para diferenciarse y que pueden ser fácilmente transformadas en otro tipo de célula, tejido u órgano (Lyndon, 1990).

Para demostrar la competencia de los tejidos vegetales se han realizado diferentes estudios que pretenden comprender los factores que intervienen en la competencia morfogénica. Para llevar a cabo estos estudios se requiere de dos medios de cultivo: uno sin reguladores del crecimiento (medio basal) y otro conteniendo reguladores del crecimiento conocidos para inducir la formación de brotes (medio de inducción) (George, 1993).

Attfield y Evans (1991) (citados por George, 1993) cultivaron segmentos de hoja de *Nicotiana tabacum* en medio basal durante diferentes tiempos, al concluir el tiempo correspondiente los explantes fueron transferidos a un medio de inducción y permanecieron un tiempo específico, posteriormente fueron sembrados nuevamente en medio basal, después de 15 días fue posible observar y estimar los brotes formados. En este caso los brotes no se desarrollaron cuando permanecieron un tiempo prolongado en el medio basal, en cambio solo requirieron de un corto periodo de inducción en medio adicionado con  $1.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{N}^6$ -benciladenina (BA) para que ocurriera la inducción. Los autores concluyeron que las mejores vías para inducir la formación de brotes fueron: 1) colocar el explante directamente en el medio de inducción y 2) colocar los explantes en medio basal 1 o 2 días, (tiempo mínimo que requirieron para ser competentes) por lo que los reguladores del crecimiento no fueron necesarios más allá de ese tiempo.

Este experimento indica, como lo señalan Christianson y Warnick (1985) citado por George (1993), que la competencia puede ser obtenida en un medio con o sin reguladores y que esto es posible a través de que las células posean o lleguen a poseer un particular nivel de sustancias reguladoras del crecimiento.

Los callos de *Nicotiana tabacum* y de *Medicago sativum* son sistemas que se han empleado para realizar estudios de competencia morfogénica, el callo es un explante que puede ser manipulado y crecer de diferentes formas, se puede mantener como callo o diferenciarse en brotes o raíces dependiendo de la proporción de auxina: citocinina en el medio. Algunos tipos de callos no hacen esto, ya que aparentemente no son competentes para ser alterados.

Las células competentes pueden ser afectadas en varias formas para alterar sus vías de desarrollo o para iniciar un nuevo tipo de desarrollo, una vez que esto ha sucedido el nuevo desarrollo es inevitable, las células están fijadas y han llegado a ser determinadas. El proceso de determinación puede ser reconocido por las células completando una nueva vía de desarrollo y no se desvían de ella (Lyndon, 1990).

Walker *et al.* (1979) citados por Lyndon (1990), experimentaron con callo de *Medicago* y observaron que este continuó su crecimiento en un medio con 2,4-D y kinetina y que para obtener raíces o brotes se requirió proporcionar al explante un pretratamiento en una adecuada proporción de auxina-citocinina para posteriormente transferirlo a un medio basal. Un pretratamiento de tres o cuatro días fue el óptimo para obtener un porcentaje adecuado de brotes y raíces en medio basal, pero si el pretratamiento fue menor o se prolongó por más días no dio como resultado un mayor número de brotes o raíces. Así mismo, el tamaño del callo influyó en la respuesta, cuando los explantes fueron pequeños, no respondieron a los tratamientos.

Este experimento demostró que: 1) los callos de *Medicago* eran ya competentes para responder a los efectos inductivos de 2,4-D y kinetina, 2) la inducción a la organogénesis (determinación) ocurre durante los pretratamientos antes de la formación de los órganos y 3) la capacidad de respuesta del explante depende del tamaño de éste.

### *Factores que influyen en la competencia*

En el cultivo de explantes deben ser analizados diversos factores durante la etapa de mayor factibilidad del desarrollo de embriones, raíces, brotes, callo, etc. y así tratar de obtener el mayor número de regenerantes (Lyndon, 1990; Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993).

George y Sherrington (1984) y George (1993) agruparon los factores que influyen en el crecimiento y la morfogénesis de los cultivos en tres grandes grupos: genotipo, medio ambiente (efecto del sustrato) y factores dependientes del tejido.

**Genotipo:** Se refiere a la constitución genética del material vegetal cultivado, se considera que los genes gobiernan la manera en la cual los tejidos u órganos crecen o manifiestan la morfogénesis *in vitro*. Barocell *et al.*(1974), citados por George y Sherrington (1984), sugieren que hay grupos de genes capaces de cambiar el desarrollo de la planta en diferentes direcciones, su efecto en condiciones de cultivo comienza a influir en el proceso de competencia en las células de proliferación y posteriormente se expresa en la morfogénesis. Diversos estudios han demostrado que existen diferencias sustanciales como en textura, color y capacidad morfogénica en variedades de plantas muy cercanas entre si y que son el efecto del genotipo de cada uno de ellas (Taire *et al.*,1977 citados por George, 1993).

**Medio ambiente (efecto del sustrato):** Es el efecto que tiene en los explantes la composición y características del medio de cultivo. Generalmente estas respuestas son dependientes del medio usado, si es sólido o líquido y/o del correcto balance de los compuestos orgánicos, inorgánicos y reguladores del crecimiento.

Un factor importante que se ha estudiado y que se expresa en las distintas respuestas *in vitro*, es el efecto que tiene la composición del medio de cultivo en los distintos explantes. Esto se realiza modificando las concentraciones de las sales minerales que constituyen las diversas formulaciones de los diferentes medios de cultivo, los niveles y tipos de carbohidratos y la reducción de los suplementos de nitrógeno que pueden influir en la morfogénesis (Thorpe y Kumar, 1993; Debergh *et al.*,1994).

Se ha observado que el crecimiento y la organogénesis *in vitro* son altamente dependientes de la interacción entre las sustancias endógenas y los reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo,

por lo que el control de la influencia de las fitohormonas en la diferenciación ha sido ya demostrado, pero su papel exacto en este proceso no es claro debido a que cada clase de fitohormonas puede producir una amplia gama de respuestas en diferentes partes y tipos de plantas (Thorpe y Biondi, 1984; Thorpe y Kumar, 1993, Lo, Giles y Sawhney, 1997).

Otros aspectos importantes a considerar son las condiciones físicas dentro y fuera del contenedor bajo las cuales crece el cultivo como son la temperatura, la humedad, la cantidad y calidad de la luz. (Bornman y Jansson, 1982 citados por Thorpe y Biondi, 1984; George, 1993; Vince-Prue, 1994).

**Factores dependientes del tejido** El crecimiento y la morfogénesis en cultivo son gobernados por muchas propiedades fisiológicas y físicas del explante el cual está generalmente relacionado con su precisa constitución genética, por lo tanto, la capacidad o competencia de los tejidos vegetales para crecer y/o ser morfológicos es un estado semipermanente de información genética que puede ser inducido y mantenido en los cultivos. Esto es debido a que algunas expresiones genéticas son persistentes y pueden permanecer en las células vegetales por largos periodos, como una memoria a largo plazo que persiste dentro de las células y es pasada a través de sucesivas generaciones celulares hasta que un nuevo estímulo ambiental sea experimentado. Se cree que esto es debido a un patrón epigenético de la expresión del gene el cual es estable y heredable durante sucesivas divisiones mitóticas pero que es potencialmente reversible y no se han pasado o transmitido sexualmente a la progenie.

Otros ejemplos de estados semi-permanentes son: las diferentes etapas fisiológicas de crecimiento, la determinación de los meristemas apicales a producir órganos de un tipo particular a lo largo de un periodo y la habituación en el cual las células no son dependientes de sustancias del crecimiento añadidas al medio de cultivo. Cada uno de estos tipos de parcial expresión genómica puede ser inducida o modificada por cultivo de tejidos particularmente por la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo (George, 1993, Lyndon, 1990).

### *Competencia morfológica en coníferas*

Pocos son los estudios que evalúan la competencia morfológica de los explantes en coníferas debido a que la mayoría de los trabajos se han enfocado a la organogénesis y embriogénesis somática.

La forma en que se realizan estos estudios es exponiendo los explantes a dos tipos de medio de cultivo; uno con reguladores del crecimiento (medio de inducción) y un segundo medio que es libre de hormonas (medio basal) y se pueden seguir dos métodos: el primero consiste en proporcionar pulsos a los explantes con altas concentraciones de reguladores del crecimiento, generalmente citocininas, estos pulsos pueden ser de horas o días, posteriormente los explantes son transferidos a un medio basal donde se expresa la respuesta morfológica.

El segundo método consiste en colocar los explantes en el medio basal durante diferentes tiempos, posteriormente se transfieren al medio de inducción donde se proporciona el pulso requerido para finalmente ser transferidos nuevamente a medio basal. El tiempo de inducción es proporcionado frecuentemente en altas concentraciones de citocininas, durante periodos cortos (pulso) más que en bajas concentraciones por largos periodos.

En embriones de *Picea abies*, von Arnold y Eriksson (1985) observaron que un pulso de 2 horas con BA 250  $\mu\text{M}$  (ca. 56  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) fue más efectivo que cultivar durante 4 semanas en medio con BA 5  $\mu\text{M}$  (ca. 1.1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

La duración exacta para la obtención de la competencia es determinada por ensayo y error al precultivar los explantes a diferentes tiempos antes de subcultivarlos al medio de inducción o medio basal.

Estudios sobre la competencia morfológica y la organogénesis en coníferas han revelado que los tejidos juveniles, embriones cigóticos o partes de plántulas (epicótilo, hipocótilo y cotiledones) son explantes

viables si lo que se desea alcanzar es la regeneración de plantas (Thorpe y Kumar, 1993). Esto lo demostraron Harry y Thorpe (1991) al colocar en medio adicionado con BA embriones cigóticos, cotiledones, hipocótilos y epicótilos de plántulas germinadas de *Picea engelmannii*; determinaron que los diferentes explantes requirieron de distintos tiempos de inducción para la formación de brotes adventicios, los embriones necesitaron 14 días, los cotiledones 21 días y el hipocótilo y epicótilo 28 días y fue posible establecer que el mayor porcentaje de brotes se obtuvo en los embriones (94.4%), seguido del epicótilo (80.7%), hipocótilo (70 %) y cotiledones (57.7%)

Así mismo ha sido posible determinar que los cotiledones son los explantes que tienen la mayor capacidad de responder a la inducción organogénica al ser expuestos a reguladores del crecimiento (Ellis y Bilderback, 1989; Attree y Fowke, 1991; Dunstan y Thorpe, 1986, citados por Thorpe *et al.*, 1991; Ruaud, 1993; David, 1982; Aitken-Christie y Thorpe, 1984 citados por Bonga y von Aderkas, 1992; García-Ferriz *et al.*, 1994) y su capacidad morfogénica depende de la edad de éstos (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Martínez-Pulido *et al.* (1990) observaron en *Pinus canariensis* que la capacidad de los cotiledones para formar brotes fue mayor en aquellos que se aislaron 3 días después de su germinación *in vitro*.

Dentro del grupo de las coníferas, *Pinus ponderosa* ha sido un modelo para estudiar la competencia morfogénica, demostrándose que los cotiledones de un solo embrión responden diferencialmente a los reguladores del crecimiento.

Ellis y Bilderback (1989) observaron en embriones de *Pinus ponderosa* colocados longitudinalmente sobre un medio adicionado con BA que los cotiledones que se encontraban en contacto con el medio formaron los meristemoides y brotes (áreas meristemáticas nodulares) *de novo*, mientras que los cotiledones superiores se elongaron y no formaron meristemoides o brotes.

Inicialmente el regulador de crecimiento utilizado con más frecuencia fue la kinetina, pero actualmente el más empleado en la mayoría de los trabajos con coníferas es la BA a diferentes concentraciones (von Arnold y Eriksson, 1979, 1981; Thorpe y Biondi, 1984; Ellis y Bilderback, 1989; García-Ferriz *et*



*et al.*, 1994), y ha sido más efectivo que el 2-*iP* u otras citocininas (Flinn *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 1991 citados por Bonga y von Aderkas, 1992).

Pocos son los trabajos que evalúan en el género *Picea*, la competencia morfogénica o el efecto de los diferentes tiempos de inducción en los explantes ya que la mayoría de los trabajos están orientados a la obtención de brotes adventicios, dentro de ellos está el de von Arnold y Eriksson (1985) que evaluaron en embriones de *Picea abies* la obtención del mayor número de brotes adventicios aplicando pulsos y distintas concentraciones de BA, estimaron que una alta concentración de BA 250  $\mu\text{M}$  (ca. 56  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) durante 2 horas fue el tratamiento más efectivo.

Debido a la problemática que presenta *Picea chihuahuana* como especie en peligro de extinción se requiere realizar estudios sobre la competencia morfogénica *in vitro* de los embriones cigóticos como fuente de explante para que sean capaces de promover la formación y desarrollo de estructuras regenerantes (brotes adventicios y/o embriones somáticos), lo que aunado a la aplicación de las técnicas *in vitro* permitirán hacer eficiente el sistema y obtener un mayor número de regenerantes, por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

### ***Objetivo general***

Se expondrán embriones cigóticos maduros de *Picea chihuahuana* a diferentes combinaciones hormonales (K/2, 4-D y BA/ANA) y tiempos de exposición para determinar la capacidad de adquirir competencia morfogénica y evaluar la capacidad regenerativa que tienen los explantes utilizados.

### ***Objetivos particulares***

1) Evaluar los períodos mínimos de incubación que requieren los embriones cigóticos maduros para la inducción de respuestas morfogénicas

2) Determinar el tipo y combinación de reguladores del crecimiento que aunado al tiempo de exposición ensayados generen el mayor número de regenerantes.

### *Materiales y Métodos*

#### *Material biológico*

Se colocaron semillas maduras de *P. chihuahuana* cosechadas en septiembre de 1993 de la localidad Las Trojas, Municipio de Bocoyna, Chihuahua, en frascos de vidrio con  $\text{CaCl}_2$  como agente desecador, se almacenaron en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) y permanecieron en esas condiciones antes de ser utilizadas.

Previo a su siembra las semillas se lavaron con agua destilada suplementada con tres gotas de Tween 80/50 ml de solución durante 10 min, seguido se colocaron en agua destilada adicionada con seis gotas de una solución (bactericida) de plata coloidal (33%) por espacio de 20 min, posteriormente se agitaron en alcohol etílico al 70% y después en blanqueador doméstico (6% de cloro activo) al 30% (v/v) durante 2 y 20 min respectivamente. En condiciones asépticas se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Con ayuda de instrumental y un microscopio estereoscópico se removió la cubierta seminal y se disecaron los embriones; se enjuagaron en una solución antioxidante (ácido cítrico más ácido ascórbico  $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ /u, pH 5.7) durante 15 min antes de ser sembrados.

#### *Competencia morfológica*

Se empleó como medio de inducción el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) constituido de los macronutrientes del B5, adicionado de los micronutrientes y componentes orgánicos del MS (Murashige y Skoog, 1962), así como de: caseína hidrolizada 100 mg, L-asparagina 100 mg, L-glutamina 400 mg, L-arginina 100 mg, ácido ascórbico 100 mg (por litro) (Chávez *et al.*, 1992a,b,c) y se suplementaron con K combinada con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y BA en combinación con ácido naftalenacético (ANA) en las concentraciones de 0/1, 1/1, 2/1, 3/0, 3/1, 4/1, 5/0, 5/1, 5/4, 2/2,  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , sacarosa  $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  y Bacto agar (Bioxon)  $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , se ajustó el pH a 5.7 con KOH y HCl 0.1 N. El medio se distribuyó en cajas petri (100 x 15 mm) con 20 ml de medio por caja.

Posteriormente del enjuague con la solución antioxidante se sembraron longitudinalmente doce embriones por tratamiento sobre el medio y se incubaron exponiéndolos a diferentes tiempos de inducción (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 24, 30 días).

Después del tiempo de exposición correspondiente, los embriones se transfirieron a medio B5 modificado con el 50% de sus componentes y sin reguladores del crecimiento (B5 50%) (medio de proliferación) adicionado con sacarosa  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  donde permanecieron 30 días.

Los cultivos en el medio de inducción se evaluaron cada semana para registrar los cambios que se presentaron, posteriormente al ser transferidos al medio B5 50%, los explantes se subcultivaron y evaluaron cada 15 días. Todos los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16 horas,  $46\text{-}48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

### *Análisis estadístico*

Los experimentos fueron organizados de acuerdo a un diseño completamente al azar con 2 repeticiones por tratamiento. Se compararon los resultados entre tratamientos, por lo que se propuso la hipótesis nula ( $H_0$ ), en la que se estableció que no habían diferencias significativas entre los tratamientos respecto a las variables respuesta evaluadas y una hipótesis alternativa ( $H_1$ ) donde se estableció que si habría un efecto de los tratamientos respecto a las variables respuesta evaluadas. Para aceptar o rechazar las hipótesis, los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD) de Fisher las que se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics versión 5.0.

De cada tratamiento se seleccionaron las combinaciones que produjeron el mayor número de brotes y se evaluaron a los 30 días. Se cuantificó el porcentaje de explantes que generaron primordios de brote, el número total de primordios y el número de primordios por embrión de los mejores tratamientos para ambos reguladores de crecimiento.

*Resultados y Discusión:*

*Morfología*

Los embriones de *P. chihuahuana* presentaron evidentes cambios morfológicos en los diferentes tiempos de inducción ensayados los que se evaluaron a los 15 días de ser transferidos a medio de proliferación (85-50%). Con un día de inducción, se observó que la ausencia de respuesta fue evidente en la mayoría de los embriones, en algunos los cotiledones se separaron entre sí formando un ángulo de 90° con respecto al hipocótilo, ocasionalmente se tornaron verdes y el hipocótilo permaneció sin cambio de coloración o de volumen (Fig. 2).



Fig. 2. Embrión de *Picea chihuahuana* con los cotiledones a 90° entre sí. Escala = 0.5 mm.

Con tres días de inducción (Fig. 3.) los cotiledones no se elongaron, permanecieron casi de su tamaño original, solo algunos se mostraron turgentes, se separaron entre sí y se tornaron de color verde, el hipocótilo se alargó, se tornó de color verde y adquirió una forma curva con la parte cóncava dirigida hacia la superficie del medio, eventualmente se desarrolló la raíz.

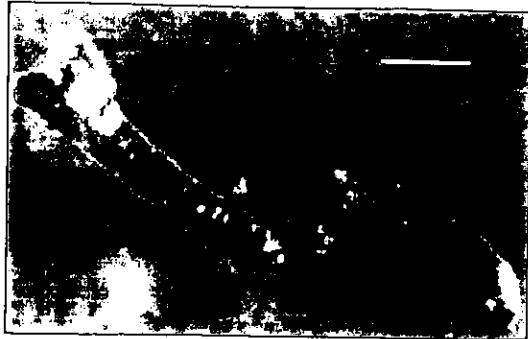


Fig. 3. Embrión después de tres días de inducción. Escala = 0.3 mm.

Entre los siete y nueve días de exposición la turgencia de los cotiledones se incrementó y mostraron un ligero engrosamiento o abultamiento en las puntas, se tornaron verdes y crecieron de forma diferencial, los cotiledones que estuvieron en contacto con el medio de cultivo incrementaron su tamaño en volumen

y aquellos que no tuvieron contacto con el medio presentaron un menor incremento de su volumen pero continuaron elongándose. El hipocótilo

se ensanchó progresivamente y se observó al igual que en *Pinus coulteri* (Patel y Berlyn, 1983) la proliferación de tejido en la base del hipocótilo, se tornó de color rojo intenso a café oscuro, posteriormente el tejido se oxidó y necrosó. Al incrementar el tiempo a catorce días de exposición, los embriones de manera general



Fig. 4 Nódulos sobre la superficie de los cotiledones, después de 14 días de inducción. Escala = 1 mm.

presentaron un mayor volumen en los cotiledones y el hipocótilo, se manifestó la proliferación de tejido en la base de los cotiledones y su superficie mostró un aspecto irregular con pequeñas estructuras nodulares (Fig. 4), proyecciones que posteriormente se evidenciaron y conformaron finalmente los primordios de brote. El hipocótilo incrementó su volumen y presentó un color rojo intenso, en algunos casos permaneció como en su forma inicial de cultivo.

A los veinticuatro días el embrión incrementó más de 4 veces su volumen inicial, particularmente los cotiledones. Fueron evidentes agrupaciones de estructuras conformadas por un nódulo central rodeado de numerosas prolongaciones a manera de pequeñas hojas, denominadas primordios de brote (Fig. 5).

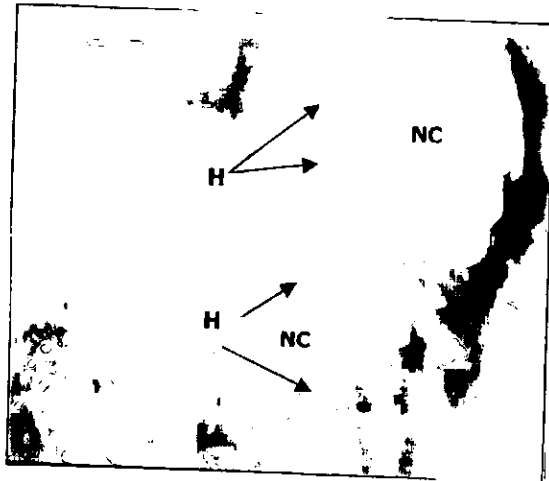


Fig. 5. Nódulo central (NC) rodeado de diminutas hojas (H) conformando los primordios de brote, a los 24 días de inducción. Escala = .5 mm.

A los treinta días los primordios de brote fueron ya evidentes, el hipocótilo se tornó de color rojo oscuro con tendencia a la oxidación y de manera general el tejido se disgregó, lo cual dificultó su manipulación.

von Arnold y Eriksson (1985), realizaron la siguiente descripción por semana de los cambios morfológicos que presentaron embriones de *Picea abies* a los cuales se les proporcionó un pulso de 2 horas con BA 250 $\mu$ M (ca. 56 mg l<sup>-1</sup>) y posteriormente fueron subcultivados en medio basal Schenk y Hildebrandt (SH).

Señalan que durante la primera semana de incubación los cotiledones y el hipocótilo fueron escasamente nodulares, mientras la raíz permaneció sin cambio o formó un pequeño callo, en la segunda semana los embriones se hincharon y adquirieron un aspecto nodular en la superficie de los cotiledones. Los cotiledones y el hipocótilo se tornaron de color verde, los primordios de brote fueron visibles durante la tercera semana y comenzaron a desarrollarse durante la cuarta semana.

Así mismo Patel y Berlyn (1983) describieron los cambios morfológicos que presentaron los embriones maduros de *Pinus coulteri* a lo largo de cuatro semanas de incubación en el mismo medio:

Los embriones después de siete días de cultivo (primera semana) mostraron la proliferación de tejido en la base del hipocótilo, sin embargo después de catorce días (segunda semana) la proliferación en la base detuvo su crecimiento y en la parte superior del hipocótilo y cotiledones comenzó la formación de callo; pequeñas proyecciones aparecieron en la superficie y costado del callo a los 21 días (tercera semana), después de cuatro semanas, el callo creció más y numerosos primordios de brote y pequeños brotes aparecieron, finalmente durante la quinta y sexta semana la superficie entera del callo se cubrió de brotes bien desarrollados.

Patel y Berlyn (1983) citan que esta secuencia es similar a las reportadas para *Pinus coulteri* por Berlyn y Beck (1980), para *Picea glauca* por Campbell y Durzan (1975) y para *Pinus radiata* por Yeung et al. (1981).

Las respuestas de *P. chihuahuana* fueron similares a la de *Pinus coulteri* y *Picea abies* respecto a los tiempos en los cuales se presentaron cambios morfológicos (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación morfológica de eventos previos a la formación de brotes adventicios cultivados *in vitro* entre dos especies de Pinaceae y *Picea chihuahuana*

	<i>Pinus coulteri</i> (Patel y Berlyn, 1983)	<i>Picea abies</i> (von Arnold y Eriksson, 1985)	<i>Picea chihuahuana</i>
1ra semana	Proliferación del tejido en la base del hipocótilo	Cotiledones e hipocótilo con poca nodulación	Crecimiento diferencial de los cotiledones, hipocótilo a veces sin respuesta
2da semana	El tejido de la base detiene su crecimiento, los cotiledones inician la formación de callo	Cotiledones con aspecto nodular, cotiledones e hipocótilo de color verde	Mayor volumen en cotiledones, superficie nodular hipocótilo color rojo intenso
3ra semana	Aparecen pequeñas proyecciones en la superficie del callo	Primordios de brote visibles	Primordios de brote visibles
4ta semana	Crecimiento del callo, presencia de numerosos primordios de brote y pequeños brotes	Desarrollo de los primordios de brote	Desarrollo de los primordios de brote, tendencia del tejido a disgregarse
5ta semana o más	Brotes bien desarrollados		

[medio de inducción y expresión con reguladores del crecimiento]

[ medio de expresión sin reguladores del crecimiento]

Las manifestaciones morfológicas, independientemente del regulador de crecimiento y tiempo de inducción fueron: el incremento en el volumen de los cotiledones, la apariencia nodular, la presencia de los primordios de brote que posteriormente se evidenciaron en brotes adventicios.

Es importante distinguir que los cambios que se presentaron en *Pinus coulteri* fueron descritos en un cultivo continuo, es decir que no se transfirieron a medio basal para evaluar la expresión morfogénica y en *Picea abies* fue evaluada la expresión morfogénica después de ser expuestos a un pulso de 2 h en una alta concentración de BA; para poder equiparar la respuesta de *P. abies* con *P. chihuahuana* sería necesario realizar un ensayo similar al que realizaron los autores, y estimar si un pulso de 2 h con altas concentraciones del regulador de crecimiento permitiera un desarrollo similar.

#### *Formación de primordios de brote*

Fue posible observar la formación de los primordios de brote en las diferentes concentraciones y tiempos de inducción ensayado a los 15 días de subcultivar el explante en medio de proliferación (B5

50%), el número de ellos estuvo en función del tiempo de exposición y combinación de los reguladores del crecimiento que se proporcionó inicialmente a los embriones.

**Tratamientos con K/2,4-D**

Los embriones expuestos a las diferentes concentraciones de K/2,4-D y sometidos a tiempos de exposición de uno a nueve días no generaron primordios de brote, éstos comenzaron a manifestarse a partir de que los explantes permanecieron mínimo 11 días en el medio de inducción y hasta los 30 días. La formación de primordios se presentó en el 44.5% de los tratamientos ensayados (Tabla 1).

El mayor número de primordios de brotes se presentó en los tratamientos (3/1) con 77, (5/0) con 71 y 75 y (3/0) con 71, en los tiempos de inducción de 24, 21, 17 y 14 días respectivamente.

Tabla 1. Total de primordios de brote desarrollados por tratamiento a los 15 días de cultivo en medio de proliferación (B5 50% y sin reguladores del crecimiento), provenientes de diferentes concentraciones de K/2,4-D y tiempos de exposición a partir de embriones cigóticos (doce por tratamiento) de *Picea chihuahuana*.

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)											
	1	3	5	7	9	11	14	17	21	24	30	Total
0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/1	0	0	0	0	0	43	33	39	48	0	0	163
2/1	0	0	0	0	0	28	18	63	40	0	0	149
3/0	0	0	0	0	0	16	71	51	54	56	30	278
3/1	0	0	0	0	0	9	55	42	50	77	20	253
4/1	0	0	0	0	0	38	34	19	41	28	35	195
5/0	0	0	0	0	0	68	67	75	71	59	53	393
5/1	0	0	0	0	0	28	24	13	23	46	44	178
5/4	0	0	0	0	0	5	14	35	37	11	11	113
2/2	0	0	0	0	0	0	20	9	24	43	10	106
<b>Total</b>						<b>235</b>	<b>336</b>	<b>346</b>	<b>388</b>	<b>320</b>	<b>203</b>	

Al evaluar los tratamientos independientemente fue posible estimar que el mayor número de brotes se registró en las concentraciones (5/0), (3/0), (3/1) y (4/1) con 393, 278, 253 y 195 primordios de brote respectivamente, y que el mejor tiempo de inducción fue el de 21 días (388).

En el resto de los tratamientos se presentó la formación de primordios que varió desde 5 a 68 y solamente la combinación (0/1) no presentó respuesta morfogénica en ningún tiempo de inducción.



*Tratamientos con BA/ANA*

La formación de primordios de brote no se desarrolló en los tiempos de exposición de uno a catorce días, sólo se manifestaron en el medio de proliferación cuando los explantes habían permanecido mínimos diecisiete días en medio de inducción (Tabla 2).

La formación de los primordios se presentó en el 62.5% de las combinaciones de BA/ANA en los tiempos de exposición entre 17 y 30 días, la mayor cantidad de primordios de brote se presentó en las combinaciones (3/0) con 50, (4/1) con 45, y (1/1) con 42 primordios, en los tiempos de inducción 24, 24 y 30 días respectivamente.

Tabla 2. Total de primordios de brote desarrollados por tratamiento a los 15 días de cultivo en medio de proliferación (B5 50% y sin reguladores del crecimiento), provenientes de diferentes concentraciones de BA/ANA y tiempos de exposición a partir de embriones cigóticos (doce por tratamiento) de *Picea chihuahuana*.

BA/ANA (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)											
	1	3	5	7	9	11	14	17	21	24	30	Total
0/1	0	0	0	0	0	0	0	38	5	8	0	51
1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	42	61
2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	20	33	14	67
3/0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	50	36	121
3/1	0	0	0	0	0	0	0	0	30	26	19	75
4/1	0	0	0	0	0	0	0	14	7	45	23	89
5/0	0	0	0	0	0	0	0	17	22	28	26	93
5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	17	22
5/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total								69	122	211	117	

Evaluando los tratamientos, independientemente fue posible estimar que el mayor número de brotes se registró en las concentraciones (3/0), (5/0), (4/1) y (3/1) con 121, 93, 89 y 75 primordios de brote respectivamente, la mayor formación de primordios de brote se presentó con 24 días de tiempo de inducción (211).

El número de primordios formados en esta combinación de reguladores del crecimiento fue menor y se manifestó en algunos de los tratamientos/tiempos de inducción en un rango de 3 a 36 primordios de brote, fue notorio que en los tratamientos (2/2) y (5/4) no se manifestó respuesta morfogénica en ningún tiempo de inducción.

Al comparar las dos combinaciones de reguladores utilizadas se observó que los embriones sometidos a los tratamientos con K/2,4-D y con tiempos de exposición de 1 a 9 días, así como en los tratamientos con BA/ANA y tiempos de exposición de 1 a 11 días no se promovió la formación de meristemoides o primordios de brote durante el tiempo de incubación en el medio de proliferación (B5 50%).

Los embriones tratados con tiempos de exposición más prolongados desarrollaron estructuras nodulares (meristemoides) sobre la superficie de los cotiledones y se observaron incipientemente a partir del noveno día de exposición en el medio de inducción con K/2,4-D y a los 14 días con BA/ANA.

*Análisis estadístico*

En la Tabla 3 se observa que el mayor porcentaje de embriones con primordios de brote que se registró en las combinaciones 3/1 y 5/0 con K/2,4-D, fue del 80%. El mayor número de primordios se obtuvo en la combinación 3/1 en el tiempo de inducción 24 con 77 primordios y el promedio de primordios por embrión que se obtuvieron fue de 6 a 6.7 en las diferentes combinaciones que se muestran en la tabla generalmente entre los 21 a 30 días de inducción, a excepción del tratamiento 3/0 con 30 días de inducción donde el promedio de primordios de brote fue de 3.3 por embrión.

Tabla 3. Número de primordios de brotes procedentes de embriones maduros de *Picea chihuahuana* expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición con K/2,4-D y subcultivados en medio B550%. Resultados después de un mes.

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (días)	Embriones con primordios de brote (%)	Total de primordios/ tratamiento	Promedio de primordios/embrión ± DS
3/1	11	20	9	3.0 ± 1.92
	14	80	55	4.5 ± 1.73
	17	60	42	4.6 ± 2.44
	21	73	50	4.5 ± 2.84
	24	80	77	6.4 ± 2.42
	30	40	20	3.3 ± 1.03
3/0	11	26	16	4.0 ± 1.4
	14	86	71	5.4 ± 1.6
	17	66	51	5.1 ± 1.3
	21	53	54	6.7 ± 1.2
	24	60	56	6.2 ± 1.2
	30	33	30	6.0 ± 1.5
5/0	11	73	68	6.1 ± 2.2
	14	80	67	5.5 ± 9
	17	80	75	6.2 ± 1.6
	21	73	71	6.4 ± 1.5
	24	66	59	5.9 ± 1.6
	30	53	53	6.6 ± 1.5

En la tabla 4 se muestran las combinaciones que formaron el mayor número de primordios de brote, en la combinación 3/0 el mayor número de primordios se registró en el tiempo de inducción de 24 días con 50 primordios, seguido de 30 y 21 días con una escasa diferencia de 36 y 35 primordios respectivamente, al obtener el promedio de brotes por embrión se observan pocas diferencias entre ellos, para la combinación 5/0 el mayor número de brotes se obtuvo en el tiempo de inducción de 24 días con 28 primordios, el promedio de primordios de brote para estos tratamientos fue de 2.8 a 4.5 por embrión. Con estos datos fue posible determinar que la combinación de K/2,4-D tiene un efecto y un rango de acción tanto en las combinaciones hormonales y en el tiempo de inducción más amplio, en contraste con las combinaciones de BA/ANA cuyo su espectro de acción fue más restringido.

Tabla 4. Número de primordios de brotes procedentes de embriones maduros de *Picea chihuahuana* expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición con K/2,4-D y subcultivados en medio B550%. Resultados después de un mes.

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (días)	Embriones con primordios de brote (%)	Total de primordios/tratamiento	Promedio de primordios/embrión ± DS
3/0	17	0	0	0
	21	53	35	4.3 ± 1.6
	24	73	50	4.5 ± 2.0
	30	80	36	3.0 ± 1.1
5/0	17	40	17	2.8 ± 0.7
	21	46	22	3.1 ± 1.5
	24	53	28	3.5 ± 1.4
	30	53	26	3.2 ± 1.6

Al analizar estadísticamente los datos de los tratamientos de K/2,4-D (Tabla 5) se observó que se presentaron diferencias significativas en los tratamientos para el número de primordios de brote, por lo que se rechazó la hipótesis nula de que no existían diferencias significativas entre el número de primordios de brotes formados con respecto los tratamientos de reguladores del crecimiento y el tiempo de exposición empleados, lo que indica que existió un efecto tratamiento/tiempo de inducción que influyó en la formación de los primordios de brote.

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable respuesta del número de primordios de botes adventicios de *Picea chihuahuana* con respecto a los tiempos de inducción y tratamientos hormonales de K/2,4-D.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Tiempos de Inducción	5	209.82336	41.96467	6.856	.0000
Tratamientos	8	856.73789	107.09224	17.496	.0000
Residual	688	4211.1254	6.1208217		
Total corregido	701	5277.6866			

Para estimar qué tratamiento y tiempo de inducción son los que denotan dicha diferencia se aplicó la prueba múltiple de comparación de medias (LSD) de Fisher. En esta prueba (Tabla 6) se distinguió el tratamiento 5/0 como el que presentó la mayor diferencia significativa, seguido de 3/0 y 3/1.

Tabla 6 Análisis de rango múltiple para los diferentes tratamientos de K/2,4-D a embriones maduros de *Picea chihuahuana*.

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Medias	Grupos homogéneos
2/2	1.3589	X
5/4	1.5128	XX
2/1	1.9102	XXX
1/1	2.0897	XXX
5/1	2.2820	XX
4/1	2.5000	XX
3/1	3.2435	XX
3/0	3.6282	X
5/0	5.0384	X

Para los tiempos de inducción (Tabla 7), se observan dos grupos el primero conformado por los tiempos de inducción de 30 y 11 días y el segundo compuesto por los tiempos de inducción 24, 14, 17 y 21 no se presentan entre ellos diferencias estadísticamente significativas, pero por los valores de las medias el tiempo de inducción de 21 días (3.3162) fue el más alto en este ensayo. Por lo tanto es posible establecer que si hay efecto de la combinación de reguladores de crecimiento y el tiempo de inducción aplicado en el número de primordios de brote generados.

Tabla 7. Análisis de rango múltiple para los diferentes tiempos de inducción ensayados en las combinaciones de K/2, 4-D a embriones de *Picea chihuahuana*.

Tiempo de inducción (días)	Medias	Grupos homogéneos
30	1.7360	X
11	2.0512	X
24	2.7777	X
14	2.8717	X
17	2.9572	X
21	3.3162	X

Para la serie de experimentos realizados con BAVANA se realizó el mismo análisis estadístico y no se encontraron diferencias significativas para el número de primordios de brote ni para los tiempos de inducción ensayados (datos no presentados). Por lo que se aceptó la hipótesis nula de que no existían diferencias significativas entre el número de primordios de brotes formados con respecto los tratamientos de fitoreguladores y el tiempo de exposición empleados.

### *Conclusiones*

Morfológicamente el aspecto y la secuencia del desarrollo que presentaron los embriones de *Picea chihuahuana* fue similar al reportado para otras especies de coníferas, la diferencia esencial fue el tiempo de inducción aplicado para promover la formación de los primordios de brote.

La formación de los primordios de brotes fue estimulada por la presencia de los reguladores del crecimiento y estuvo en estrecha relación con el tiempo que permanecieron los explantes en contacto con los reguladores.

En los tratamientos con K/2,4-D la formación de los primordios de brote se manifestó cuando los embriones permanecieron un mínimo de 11 días en cultivo y en las combinaciones de BA/ANA se requirió de 14 días mínimo.

En las mejores combinaciones de K/2,4-D el promedio de primordios por embrión obtenidos fue de 3.0 a 6.7.

En los mejores tratamientos de BA/ANA el promedio de primordios por embrión obtenidos fue de 2.8 a 4.5.

Las mejores respuestas respecto a la generación de primordios de brote en menor tiempo de exposición a los reguladores se obtuvieron en la combinación K/2,4-D en contraste con BA/ANA.

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de K/2,4-D y tiempos de inducción ensayados; en los ensayos realizados para BA/ANA no se presentaron estas diferencias.

Dentro de las investigaciones realizadas en el grupo de las coníferas son escasos los estudios realizados con relación a la competencia morfológica y para *Picea chihuahuana* es el único trabajo reportado, por lo que la presente investigación es una importante aportación en esta área.

**Bibliografía**

- Attree SM, Fowke LC. 1991. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. *In*: Bajaj YPS (ed.). High-tech and Micropropagation Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17:53-70. Springer-Verlag, Berlin.
- Bonga JM, von Aderkas P. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Press. Netherlands, 236 p.
- Chávez VM, Litz RE, Moon PA, Norstog DK. 1992a. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. Robusta (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:59-63.
- Chávez VM, Litz RE, Norstog DK. 1992b. *In vitro* Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:93-98.
- Chávez VM, Litz RE, Norstog K. 1992c. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:99-105.
- Debergh P, de Riek J, Matthys D. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. *In*: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 19-30.
- Ellis DD, Bilderback E. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 76(3):348-355.
- Flinn BS, Webb D, Newcomb W. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Can. J. Bot.* 66: 1556-1565.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- García-Ferriz L, Serrano L, Pardós LA. 1994. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:135-140.
- George E, Sherrington P. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited. England. 690 p.
- George E. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited. England. 550 p.
- Harry IS, Thorpe TA. 1991. Engelmann Spruce (*Picea engelmannii* Parry ex. Engelm.) *In*: Bajaj, YPS (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees III, Vol 16, pp. 408-422. Springer-Verlag Berlin.
- Lo KH, Giles KL, Sawhney VK. 1997. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha confusa* hybrids (African violet) cultured *in vitro* *Plant Cell Reports* 16:416-420.
- Lyndon RF. 1990. Plant development: The cellular basis. Chapter Ten. Competence and determination in differentiation, London Uniwin Hyman. pp 203-231.
- Martínez-Pulido C, Harry IS, Thorpe T. 1990. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). *Can J. For. Res.* 20:1200-1211.



- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-487.
- Patel KR, Berlyn GP. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Can. J. Bot.* 61:575-585.
- Ruud JN. 1993. Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56 days-old *Picea abies*. *Plant Science.* 92: 213-220.
- Schenk RU, Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Thorpe TA, Biondi S. 1984. Fibers and Wood. Chapter 16 Conifers. *In: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y. (eds.). Handbook of Plant Cell Culture, Crop-Science., Vol. 2: pp 435-503. McMillan Publishers, New York.*
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP. 1991. Application of micropropagation to forestry. *In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 311-335.*
- Thorpe TA, Kumar PP. 1993. Cellular control of morphogenesis. *In: Ahuja MR (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 11-29.*
- Vince-Prue D. 1994. Photomorphogenesis and plant development. *In: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 19-30.*
- von Arnold S, Eriksson T. 1979. Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. *Plant Science Letters*, 15: 363 – 372.
- von Arnold S, Eriksson T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* Can. J. Bot. 59: 870-874.
- von Arnold S, Eriksson T. 1985. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 64:41-47.

### *Generalidades del cultivo de tejidos*

Es posible predecir que la demanda mundial de productos forestales se elevará agudamente en las próximas décadas. Esto puede ser fácilmente confirmado al considerar el incremento en la demanda de productos como la pulpa, el papel, la madera de las industrias fabricantes de muebles, así como por la necesidad ecológica de la reforestación y las posibilidades de mitigar el incremento de la demanda de energía para la obtención de combustible a partir de productos vegetales lo que aunado a los rápidos y devastadores efectos de los incendios, enfermedades y plagas ponen en peligro a las especies forestales (Keays, 1974; Karnosky, 1981, citados por Thorpe y Biondi, 1984).

Los métodos tradicionales de propagación vegetativa comprenden el enraizamiento de estacas, de brotes laterales e injertos y son los árboles de madera dura más fáciles de enraizar que las coníferas. El éxito del enraizamiento depende de la época en que fueron colectados los fragmentos, la edad y su posición dentro del tallo del árbol donador, del tratamiento con auxinas así como de las condiciones de enraizamiento (Thompson, 1984, citado por Thorpe y Biondi, 1984). En Japón, la propagación por esquejes se ha utilizado desde hace varias centurias en *Cryptomeria japonica* y más recientemente en Suiza con *Picea abies* se han logrado obtener 2.5 millones de esquejes anuales.

En la mayoría de las coníferas, la propagación por el método del enraizamiento de esquejes o estacas está en función de los diferentes estados de desarrollo y está frecuentemente caracterizada por la rápida pérdida de la capacidad de enraizamiento del ramet cuando se incrementa la edad de la planta madre (Thorpe y Biondi, 1984). La propagación vegetativa de muchas coníferas está limitada por los cambios fisiológicos que ocurren durante su maduración, la cual vuelve a los tejidos maduros incapaces de responder al estímulo organogenético externo.

El cultivo de tejidos vegetales es una alternativa con un alto potencial para lograr la propagación masiva de especies de interés ecológico y/o económico, a partir de estructuras sexuales o somáticas y la regeneración de nuevos individuos puede llevarse a cabo vía organogénesis o embriogénesis somática. Para obtener una u otra respuesta morfogénica es importante considerar factores determinantes como la selección del tejido por sembrar el cual debe estar en una etapa fisiológica competente (capacidad de regenerar nuevos individuos) y la presencia oportuna de reguladores de crecimiento para la inducción y maduración de los regenerantes

(Attree y Fowke, 1991; Lu *et al.*, 1991). Con base en el estudio experimental de estos factores ha sido posible durante los últimos 20 años la multiplicación *in vitro* de más de 70 especies de angiospermas y de alrededor de 30 especies de gimnospermas (Thorpe *et al.*, 1991).

#### *Cultivo de tejidos en gimnospermas*

Las gimnospermas son especies difíciles de propagar de manera tradicional y en comparación con las angiospermas son menos los trabajos *in vitro* que reportan su propagación con éxito. En este grupo se ha trabajado principalmente con estructuras ligadas a las semillas debido a que los intentos con estructuras somáticas jóvenes o de plantas adultas generalmente han fallado (Attree y Fowke, 1991; Chávez *et al.*, 1992c).

Los árboles maduros que han demostrado tener un genotipo superior son más atractivos para su propagación masiva, sin embargo es más difícil establecer cultivos de brotes a partir de árboles maduros que de plantas jóvenes (von Arnold y Wallin, 1988). Aunque los tejidos jóvenes de coníferas son una fuente común, éstos maduran y sólo son capaces de responder a un estímulo organogénico en las primeras semanas posteriores a la germinación y además se ha observado que los tejidos de coníferas son extremadamente difíciles de cultivar *in vitro* (Mott, 1981; David, 1982, citados en Attree y Fowke, 1991).

Las tres principales formas de micropropagación clonal o vegetativa de plantas por medio del cultivo de tejidos son:

1. la elongación de brotes axilares
2. la producción de brotes adventicios por organogénesis y
3. la embriogénesis somática (von Arnold y Wallin, 1988; Bonga y von Aderkas, 1992; Thorpe *et al.*, 1991).

### *Elongación de brotes axilares*

Este es un método directo que utiliza meristemos con primordios foliares, brotes laterales y pequeños esquejes nodales, que involucra la manipulación de brotes preformados; usualmente se da sin la formación de callo, produce en general cultivos genéticamente estables y da un pequeño número de plantas.

Se presenta cuando las yemas axilares se liberan de la dominancia apical, principalmente por la manipulación de hormonas en el medio nutritivo; en coníferas las yemas que pueden estar o no en reposo han sido utilizadas, estos explantes requieren de pretratamientos o condiciones especiales de cultivo para crecer y multiplicarse *in vitro*.

Este método de propagación es más común en especies de madera dura que en coníferas, aunque ha funcionado para algunas especies de *Pinus*, como en *P. caribaea* y *P. oocarpa* (Baxter *et al.*, 1989 citado por Bonga y von Aderkas, 1992). Aún así la propagación masiva está limitada a árboles jóvenes y cuando ha habido éxito, sólo un número escaso de plantas se forma y el enraizamiento es difícil (Thorpe *et al.*, 1991). Entre los reportes están el de von Arnold y Tillberg (1987) quienes desarrollaron brotes adventicios a partir de yemas vegetativas de *Picea abies* al proporcionarles pulsos de tres horas a 250  $\mu\text{M}$  (ca. 56.17 mg l<sup>-1</sup>) de BA.

### *Organogénesis*

Es la vía que actualmente se utiliza para la regeneración de especies forestales y se logró por primera vez en 1975 por Sommer y col. en cultivos de embriones de *Pinus palustris*, es a partir de este trabajo que se han generado diversas investigaciones con relación a la formación de brotes adventicios, algunos de ellos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Investigaciones realizadas en gimnospermas en las cuales se ha promovido la regeneración de brotes adventicios por organogénesis.

Familia	Género y Especie	Referencia
Araucariaceae	<i>Araucaria angustifolia</i>	Winton, 1978. **
	<i>A. cunninghamii</i>	Haines y de Fossard, 1977. **
Cupressaceae	<i>Thuja plicata</i>	Colemar y Thorpe, 1977. **
Pinaceae	<i>Picea abies</i>	von Arnold y Eriksson, 1979, 1985. von Arnold y Tillberg, 1987.
	<i>P. glauca</i>	Campbell y Durzan, 1976. ** Rumary y Thorpe, 1983. **
	<i>P. mariana</i>	Rumary y Thorpe, 1984. **
	<i>P. sitchensis</i>	Webb y Street, 1978. **
	<i>Pinus eldarica</i>	Wagley <i>et al.</i> , 1987.
	<i>P. banksiana</i>	Harry y Thorpe, 1994.
	<i>P. contorta</i>	von Arnold y Eriksson, 1981.
	<i>P. omorika</i>	Kolevska y Buturović, 1995.
	<i>P. pinea</i>	García - Ferriz <i>et al.</i> , 1994. González <i>et al.</i> , 1998.
	<i>P. pinaster</i>	David <i>et al.</i> , 1978. ** Calixto y Pais, 1997.
	<i>P. ponderosa</i>	Ellis y Bilderback, 1989.
	<i>P. radiata</i>	Reilly y Washer, 1977. ** Villalobos, 1985 tesis doctoral
	<i>P. taeda</i>	Mehra-Palta <i>et al.</i> , 1978.
	<i>P. wallichiana</i>	Mathur y Nadgauda, 1999.
Taxodiaceae	<i>Sequoia sempervirens</i>	Ball, 1978, Boulay, 1979**

\*\* Tomado de Thorpe y Biondi (1984)

De manera general, la micropropagación de coníferas es un proceso constituido de varias etapas:

- > el establecimiento aséptico del cultivo y la inducción de brotes,

- la multiplicación y desarrollo de brotes,
- el enraizamiento de los brotes,
- la aclimatización de las plántulas (Thorpe y Biondi, 1984; Thorpe *et al.*, 1991).

Desafortunadamente las tasas de multiplicación pueden ser limitadas en alguno de estos pasos.

Thompson (1984), señala que existen trabajos con datos que pueden ser engañosos con respecto a la generación de un gran número de brotes como en *Pinus radiata* y en *Pseudotsuga menziesii* en los que se ha reportado la regeneración a partir de semilla de 180 y 221 brotes respectivamente, pero como ya se observó, las tasas de multiplicación pueden estar limitadas por diversos factores y a veces hay que tomar con reserva los resultados.

La formación de brotes adventicios involucra una serie de factores como son:

a) el explante utilizado, en el influye:

- ❖ el órgano que sirve como tejido inicial,
- ❖ la fisiología y ontogenia del órgano,
- ❖ la época en la cual el explante fue obtenido,
- ❖ el tamaño del explante y
- ❖ la calidad de la planta del cual el explante fue tomado (von Arnold y Eriksson, 1979, 1980; Thorpe *et al.*, 1991; García-Ferríz *et al.*, 1994);

b) el medio de cultivo utilizado con sus diferentes formulaciones y concentraciones. Se ha observado que la formulación completa del medio de cultivo no es siempre la óptima y se ha empleado a la mitad o a una cuarta parte de su composición. La adición de una fuente de carbono, vitaminas y la reducción de suplementos nitrogenados pueden influir en la morfogénesis (Thorpe *et al.*, 1991; Thorpe y Kumar, 1993; García-Ferríz *et al.*, 1994; Harry y Thorpe, 1994) y

c) las condiciones de incubación que se utilicen. Las más importantes son: temperatura, luz e intercambio gaseoso, por lo que las modificaciones que se realicen en uno o varios de ellos nos proporcionarán diferentes respuestas. La influencia de la luz en diversos cultivos ha sido estudiada y ha sido posible estimar tasas de crecimiento mayores en *Pseudotsuga menziesii* cuando son expuestos los cultivos a 16 o 24 hrs de

luz por día que con 8 hrs de exposición, así mismo se ha observado que la elongación de los tallos y el crecimiento radial en estos cultivos fue mayor al ser expuestos a luz constante a 25°C que en un régimen de 25/17°C luz/obscuridad (Evers, 1981 citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

En coníferas, la formación de brotes adventicios de forma directa es común y se da principalmente a partir de hipocótilos y cotiledones de embriones así como en hojas de plántulas recién germinadas (Bonga y von Aderkas, 1992), en cambio la formación de brotes adventicios vía indirecta es un evento poco usual en coníferas si lo comparamos con las angiospermas y son escasos los reportes de la regeneración de plantas por esta vía.

El primer trabajo reportado fue el realizado por Gladfelter y Phillips en 1987 en *Pinus eldarica* en el cual a partir de diferentes partes de semillas germinadas *in vitro* obtuvieron callo que al ser transferido a otro medio de cultivo se promovió el desarrollo y maduración de brotes. Más recientemente este evento fue reportado en *Picea engelmannii* por Harry y Thorpe en 1991, pero los brotes adventicios generados a partir de callo no se elongaron lo suficiente para realizar ensayos de enraizamiento.

La formación de plántulas por esta vía da lugar a la producción de brotes unipolares y obliga a promover su enraizamiento, proceso que comúnmente requiere de numerosas etapas subsecuentes. El proceso organogénético que involucra la inducción de tejido meristemático por los tratamientos de las fitohormonas y su preciso papel no es claro aún.

### ***Embriogénesis somática***

La embriogénesis somática ofrece la ventaja de obtener regenerantes bipolares (embriones), es decir con un meristemo apical y uno radicular. La inducción de embriones somáticos a partir de tejidos no embriogénicos de árboles maduros de fenotipo conocido es deseable y presenta ventajas si es comparada con la organogénesis por que: a) no se requiere promover el enraizamiento como en los brotes adventicios, b) es un método efectivo para una rápida propagación y generar una gran cantidad de plantas, c) las suspensiones embriogénicas obtenidas de callos embriogénicos pueden servir como fuente para protoplastos embriogénicos y ser utilizados en la ingeniería genética, y d) una gran cantidad de embriones somáticos pueden ser almacenados con relativa facilidad (Boulay, 1987 citado por Thorpe *et al.*, 1991).

La embriogénesis somática en gimnospermas ha sido obtenida en varias de especies de cícadas y coníferas como se muestra en la Tabla 2.

En cícadas la morfogénesis *in vitro* de *Zamia floridana* A. CD. fue descrita por La Rue (1948, 1954) quien obtuvo brotes haploides por organogénesis y embriones somáticos a partir de megagametofitos. En coníferas se logró por primera vez en cultivos de embriones inmaduros de *Picea abies* por Hakman y colaboradores (1985) y de forma independiente por Chalupa (1985) (citados por Attree y Fowke, 1993).

Tabla 2 Investigaciones realizadas en gimnospermas donde se ha promovido la embriogénesis somática.

Familia	Género y Especie	Referencia
Cicadales	<i>Ceratozamia mexicana</i>	Chávez <i>et al.</i> , 1992a
	<i>C. hildae</i>	Chávez <i>et al.</i> , 1992b
	<i>Zamia floridana</i>	LaRue 1948, 1954 **
	<i>Z. integrifolia</i>	Norstog, 1965 **
	<i>Z. fischeri</i>	Chávez <i>et al.</i> , 1992c
	<i>Z. turluracea</i>	
	<i>Z. pumila</i>	
Pinaceae	<i>Picea abies</i>	Hakman <i>et al.</i> , 1985 ** Von Arnold y Hakman, 1986 ** Hakman <i>et al.</i> , 1990 ** Mo y Von Arnold, 1991 **
	<i>P. engelmannii</i>	Web <i>et al.</i> , 1989 **
	<i>P. glauca</i>	Attree <i>et al.</i> , 1991 ** Misra <i>et al.</i> , 1993 ** Tremblay, 1990 Hakman y Fowke, 1987 **
	<i>P. mariana</i>	Tremblay y Tremblay, 1991
	<i>Pinus caribaea</i>	Lainé y David, 1992 **
	<i>P. elliotti</i>	Jain <i>et al.</i> , 1989 **
	<i>P. radiata</i>	Chandler <i>et al.</i> , 1989 **
	Taxodiaceae	<i>Sequoia sempervirens</i>

\*\* Tomado de Attree y Fowke (1993)



La embriogénesis somática generalmente es iniciada en el mismo medio de la organogénesis y en la mayoría el 2,4-D es utilizado como auxina (Bonga y von Aderkas, 1992).

Los embriones *in vitro* requieren de distintos medios de acuerdo a su grado de desarrollo, para inducir respuestas morfogénicas. Se ha observado que embriones somáticos expuestos en un medio con citocininas y auxinas continúan proliferando pero no maduran por lo que debe encontrarse el periodo de incubación en el medio inductor para hacer subcultivos a otros regímenes y lograr el estado de plántula (Ellis y Bilderback, 1989; Attree y Fowke, 1991, 1993).

Aunque el número de especies que se han regenerado por este método se ha incrementado, el porcentaje de plantas recuperadas es relativamente bajo. En el abeto Noruego (*Picea abies*), se ha estimado que menos del 1% de los embriones inducidos se desarrollan en plantas (Becwar *et al.*, 1989, citados por Thorpe *et al.*, 1991).

Para lograr la maduración de los embriones somáticos Bozhkov *et al* (1993) y Ruaud (1993) respectivamente han realizado estudios de la influencia del balance del nitrógeno en el medio de cultivo para estimular el desarrollo de los embriones de *Picea abies*, así como diversos ensayos para promover la maduración y su progreso en plántulas utilizando diferentes tratamientos con ácido abscísico (ABA).

Una revisión extensa en relación con las diversas técnicas y sustancias empleadas para algunos géneros de gimnospermas fue realizada por Jain *et al.* (1995).

### ***Reguladores del crecimiento***

Para cualquier proceso descrito anteriormente la presencia de los reguladores del crecimiento es un factor determinante y existe un amplio rango de respuestas morfogénicas en diferentes explantes que se pueden manifestar. La organogénesis *de novo* generalmente requiere de fitohormonas exógenas y en particular el balance auxina-citocinina ha mostrado su influencia en el patrón de diferenciación (Skoog y Miller, 1957 citado por Villalobos *et al.*, 1984; Thorpe, Harry y Kumar, 1991).

La condición o niveles de las citocininas endógenas, así como el modo de acción en los tejidos de coníferas permanece aún sin ser claro, lo que sí es evidente es que los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en la generación de nuevos brotes.

En los diversos trabajos de organogénesis que se muestran en la Tabla 1 se ha empleado preferentemente la BA como inductor de la organogénesis y generalmente se aplica en concentraciones por arriba de 5 mg l<sup>-1</sup>.

En coníferas se ha observado que la citocinina exógena es suficiente para promover la formación de brotes (Thorpe, 1980; Biondi y Thorpe, 1982 citados por Villalobos *et al.*, 1984). En un estudio realizado con *Pinus radiata* se determinó que se requiere sólo la presencia de BA para la formación de tejido meristemático para que se lleve a cabo la formación de brotes (Aitken *et al.*, 1982 citado por Villalobos *et al.*, 1984). Sin embargo, la citocinina debe estar presente durante los tres primeros días de cultivo para que pueda ocurrir la formación de brotes y 21 días de cultivo para la óptima formación de los mismos (Biondi y Thorpe, 1982 citados por Villalobos *et al.*, 1984).

#### *Desarrollo de brotes*

Sobre la regeneración de brotes adventicios en coníferas se han realizado estudios que establecen su desarrollo y se ha podido definir que durante la formación de los brotes se presenta el incremento en el tamaño del explante y la formación de un tejido nodular que ha sido denominado "centro meristemático de brote" o "tejido meristemático" respectivamente por Mott (1981) y Reilly y Brown (1976) ambos citados por Thorpe y Biondi (1984). Después de 3 a 6 semanas de cultivo se incrementa el tamaño del explante y se presentan estructuras que han sido denominadas "protuberancias como domos", "meristemoides" u "órganos como escamas" respectivamente por Coleman y Thorpe (1977); Yeung *et al.* (1981) y von Arnold y Eriksson (1978), citados por Thorpe y Biondi (1984).

Así mismo von Arnold y Eriksson (1979) y Cheah y Cheng (1978) describieron la ontogenia de estas estructuras hasta la formación del brote adventicio por medio de cortes histológicos de cotiledones de *Picea abies* y *Pseudotsuga menziesii* respectivamente.

Morfológicamente se puede englobar el desarrollo de los brotes adventicios en las siguientes fases:

- ◆ **meristemoides**, se observa que el explante incrementa su volumen y se forma un tejido nodular llamado "centros meristemáticos" o "tejido meristemático".
- ◆ **primordio de brote** el cual es un meristemoide y da lugar a la formación de un primordio de brote arriba de la superficie del cotiledón,
- ◆ **brotos adventicios en etapa temprana** que comprenden el ápice meristemático con primordios foliares los cuales se observan como pequeñas prolongaciones en ambos lados del meristemo y
- ◆ **brotos adventicios** que consisten en la elongación del brote, la maduración del primordio foliar y la formación de nuevas hojas que continúan emergiendo cerca del meristemo, debajo de éste, el tallo se diferencia y posteriormente se desarrolla el brote completo.

En cada una de estas fases hay que considerar varios aspectos. Durante la formación de los meristemoides está la influencia del regulador del crecimiento y el tiempo de exposición del explante al medio inicial; para lograr la formación de los brotes se han realizado modificaciones al medio de cultivo en la cantidad de sales que contiene, diluyéndolo generalmente a la mitad (von Arnold y Eriksson, 1979, 1981; Harry y Thorpe, 1994); en la reducción o eliminación de los reguladores del crecimiento (Jelaska, 1987 citado por Bonga y von Aderkas, 1992) y en la eliminación de la cantidad de amonio (Dunstan y Mohammed, 1986 citado por Bonga y von Aderkas, 1992). Para la conformación de los primordios de brotes, así como su posterior desarrollo y elongación se han llevado a cabo modificaciones en el medio como la reducción en la concentración de sacarosa (Rumary y Thorpe, 1984 citado Bonga y Von Aderkas, 1992) y/o la incorporación de carbón activado con el fin de promover la elongación de los brotes debido a que probablemente la presencia de este compuesto absorba el exceso de hormonas o sustancias como los fenoles que inhiben el desarrollo de los brotes, además su presencia hace que los tejidos se tornen de color café oscuro hasta necrosarse (Harry y Thorpe, 1994; Tsogas y Bouriqet, 1982 citados por Bonga y von Aderkas, 1992),

En etapas más avanzadas del desarrollo de los brotes adventicios y lograr su enraizamiento, se requiere transferir los explantes a medios modificados en el contenido de sus nutrimentos y/o con diferentes niveles hormonales, de este modo la separación de los brotes será posible y facilitará el enraizamiento (Mehra-Palta *et*

*al.*, 1978, Thorpe y Biondi, 1984; Harry y Thorpe, 1994; García-Ferriz *et al.*, 1994; Budimir y Vujičić, 1992; Raud, 1993, Mathur y Nadgouda, 1999.).

Estas modificaciones deben realizarse con reserva, tomando en cuenta que cada especie responde de forma diferente, debido a que puede haber inhibiciones o un desarrollo favorable en el crecimiento de los brotes; en algunos casos, una baja concentración de carbón activado ha incrementado la longitud de los brotes o bien, altas concentraciones pueden causar necrosis de las acículas.

### ***Enraizamiento***

La micropropagación *in vitro* vía organogénesis requiere esencialmente de la inducción y la formación de raíces en los brotes (Blazková *et al.*, 1997), para lograrlo se requiere proporcionar al brote diferentes condiciones de cultivo.

Muchos factores pueden influir en el enraizamiento, se ha sugerido que su iniciación es regulada por el balance entre hormonas (Batten y Goodwin, 1978, citado por Blazková *et al.*, 1997), este puede lograrse al adicionar auxinas al medio de cultivo: ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) solos o en diferentes combinaciones y concentraciones (Thorpe y Biondi, 1984; von Arnold y Wallin, 1988), debido a su alta estabilidad y habilidad para inducir raíces, el AIB y otras auxinas sintéticas son usadas preferentemente sobre el AIA, debido a que es rápidamente metabolizado o degradado y por lo tanto inactivado cuando se aplica. El AIB conjugado ha sido reportado como un activo inductor de raíces (Plüss *et al.*, 1989; Weisman *et al.*, 1989 citados por Blazková *et al.*, 1997).

Diferentes aspectos sobre la ocurrencia, biosíntesis, transporte y metabolismo del AIB en plantas se han estudiado recientemente, sin embargo, ha sido difícil establecer una clara relación entre la variación en las auxinas libres y las ligadas y el control del enraizamiento (Epstein y Ludwig-Muller, 1993; Gaspar y Hofinger, 1988 citados por Blazková *et al.*, 1997).

Diversas observaciones han demostrado que para promover el desarrollo de la raíz, es conveniente tratar a los brotes con un pulso de altas concentraciones de auxinas en tiempos cortos y posteriormente colocarlos en medio libre de hormonas, ésto ha parecido ser más eficiente que largos tratamientos con bajas concentraciones. El enraizamiento se puede efectuar en condiciones asépticas (*in vitro*) o no, los brotes ya listos para ser

enraizados pueden ser colocados en medio o mezclas de sustratos en condiciones asépticas o no asépticas (von Arnold y Wallin, 1988).

Otra variantes que se realizan con frecuencia para promover el enraizamiento son: la reducción del contenido de los minerales y de sacarosa en el medio, así como modificaciones en la temperatura y el fotoperiodo (Thorpe y Biondi, 1984; Mathur y Nadgauda, 1999). Gladfelter y Phillips (1987) reportaron que solo el 5% de los brotes adventicios de *Pinus eldarica* lograron enraizarse; las raíces se observaron bien formadas y mostraron una conexión vascular continua con el brote.

Recientemente estos investigadores han promovido un incremento del 80% en la frecuencia de enraizamiento, modificando ciertas condiciones de cultivo, utilizaron temperatura constante (24°C) y combinaron la luz fluorescente e incandescente. El enraizamiento fue inducido al colocar los brotes 18 días en medio Gresshoff y Doy (1972) (GD) al 50%, adicionado con 10 mg·l<sup>-1</sup> de AIB (Hutt y Amerson, 1981 citados por Phillips y Gladfelter, 1991).

En otras especies, como *Pinus elliottii* la formación de las raíces se logró al transferir los brotes de un medio suplementado con una combinación de citocininas-auxinas BA y ANA en medio sin reguladores del crecimiento, los brotes presentaron en la base un incremento en su volumen y fue posible obtener por este método aproximadamente el 90% de raíces eficientes (Lesney, 1991).

El tamaño de los brotes parece ser un factor más que considerar para promover el enraizamiento, en *Pinus oocarpa* se utilizaron brotes de 5 mm de longitud para promover el enraizamiento, pero se obtuvo un mayor éxito en aquellos brotes que tenían 1 cm de longitud (Schwarz *et al.*, 1991).

En coníferas es raro el enraizamiento espontáneo *in vitro* y es más difícil comparado con las angiospermas (Sommer y Caldas, 1981 citados por Thorpe y Biondi, 1984; von Arnold y Wallin, 1988). Se ha reportado que menos del 5% de las coníferas regeneradas desarrollan raíces espontáneamente (Mohammed y Vidaver, 1988) en el Abeto azul (*Picea pungens*), menos del 20% de las plántulas desarrollan raíces y detienen su crecimiento entre los 2 y 3 cm (Afele y Saxena, 1995).

*Antecedentes de estudios realizados en el género Picea*

En el grupo de las coníferas se han realizado más trabajos de micropropagación en el género *Pinus* que en el género *Picea*, en la Tabla 3 se señalan algunos de estos trabajos, los que comprenden la regeneración de brotes adventicios y embriones somáticos.

Tabla 3.- Algunos trabajos realizados en especies del género *Picea* que han producido plántulas *in vitro* por organogénesis o embriogénesis somática

Especie	Explante	Reguladores (mg l <sup>-1</sup> )	Medio de inducción	Medio de proliferación	Respuesta	Referencia
<i>Picea abies</i>	ac	BA 44	LP	LP basal	ba	von Arnold y Eriksson, 1979
	ec	BA 22.20	SH50%	SH50% basal	ba	von Arnold y Eriksson, 1985
	yv	BA 56.17	LP	LP basal	ba	von Arnold y Tillberg, 1987
<i>Picea omarika</i>	ec	K 44 BA + K (22.2 + 23.2) BA + 2iP (22.2 + 24.6)	MS50%	MS1/3 basal	ba	Kolevska y Buturović, 1995
	bra	BA (28.0) o K (26.8)				
	bra + c	BA 1.02	BM	BM 50% basal	ba	Budimir y Vujičić, 1992
<i>Picea engelmannii</i>	ec	BA 44 + ANA 10µM	AE	AE + 25 µM	ba	Lu y Thorpe, 1988 **
		BA 5.63 + 2,4-D 45.2	AE	AE	es	
	ec	BA 44	AE	AE	ba	Patel y Thorpe, 1986 **
	c	BA 44	AE	AE	ba	
	hc	BA 44	AE	AE	ba	
epc	BA 44	AE	AE	ba		
<i>Picea sitchensis</i>	C	BA 89.8	MS	MS50% basal	Ba	Drake <i>et al.</i> , 1997

ac = Acículas; bra = Brote apical; bra + c = Brote apical con cotiledones unidos; ba = Brote adventicio; c = Cotiledones; ec = Embrión cigótico; ei = Embrión inmaduro; epc = Epicótilo; hc = Hipocótilo; yv = Yema vegetativa  
 \*\* Tomado de Thorpe, Harry y Kumar, 1991.

En los trabajos señalados en la Tabla 3 la regeneración de brotes adventicios se ha logrado utilizando medios de cultivo con bajo contenido de nitrógeno y adicionados con BA como regulador del crecimiento para estimular la formación de éstos.

#### *Antecedentes de estudios realizados en Picea chihuahuana*

En *P. chihuahuana* se han realizado algunos ensayos para promover el desarrollo de respuestas morfogénicas *in vitro* y lograr la formación de regenerantes que tengan las características deseables para su posterior desarrollo en invernaderos y reintroducción en zonas protegidas comprendidas dentro del área de influencia del proyecto Bosque Modelo Chihuahua o en sus localidades originales.

Chaparro (1992) determinó las condiciones para el cultivo *in vitro* de esta especie. Obtuvo callo a partir de acículas y además logró establecer el mejor medio para promover el desarrollo de plántulas, a partir de embriones maduros.

Montes (1993) en un manual básico de cultivo de tejidos señaló la metodología para establecer los cultivos asépticos, así como las condiciones de cultivo para la formación de brotes adventicios a partir de semillas maduras, su individualización y enraizamiento.

Así mismo Jacob (1994) realizó estudios isoenzimáticos de las escasas poblaciones de esta especie, determinó la magnitud de la variación genética de 11 poblaciones y comparó la variación intra e inter poblacional para estimar las distancias genéticas existentes.

Debido a la importancia ecológica, evolutiva y además por estar catalogada como especie en peligro de extinción, es importante establecer estrategias adecuadas que permitan la propagación y conservación de *Picea chihuahuana*, a través de las técnicas de cultivo de tejidos las cuales ofrecen la posibilidad de obtener regenerantes previo conocimiento de la capacidad morfogénica de sus explantes. Por lo anteriormente señalado se establecieron los siguientes objetivos.

**Objetivo general:** Obtener plántulas regeneradas *in vitro* de *P. chihuahuana*, a partir de embriones cigóticos por cualquier vía organogénica, lograr su maduración, desarrollo, enraizamiento y establecimiento *ex vitro*.

**Objetivos particulares:**

- 1) Definir la concentración óptima de fitorreguladores donde se manifieste cualquier respuesta morfogénica.
- 2) Evaluar las respuestas morfogénicas que se presenten en las diferentes combinaciones de auxinas/citocininas y tiempos de exposición.
- 3) Promover el desarrollo de cualquier estructura que se manifieste (embriones somáticos y/o brotes adventicios), su maduración, rizogénesis y establecimiento *ex vitro*.



## *Materiales y Métodos*

### *Inducción de brotes adventicios*

Se utilizó como medio de inducción el mismo que se empleó para la competencia morfogénica (B5) modificado (Gamborg *et al.*, 1968), su formulación se señala en el Capítulo II.

El medio se distribuyó en cajas petri (100 x 15 mm) con 20 ml de medio por caja. Posteriormente los embriones fueron desinfectados y disecados como se describe en el Capítulo II, se remojaron durante 30 min en solución antioxidante (ácido ascórbico más ácido cítrico 250 mg·l<sup>-1</sup> cada uno, pH 5.7), se sembraron longitudinalmente sobre el medio, se incubaron aplicándoles los diferentes tiempos de inducción ensayados en las pruebas de competencia morfogénica, enfatizando en aquellos donde se presentó una mayor formación de primordios de brote con base en los resultados obtenidos.

Con base en los resultados obtenidos en la competencia morfogénica (Capítulo II) para las combinaciones de K/2,4-D se emplearon tiempos de inducción de 11, 14, 17, 21, 24, 30 días y para las combinaciones de BA/ANA: 17, 21, 24 y 30 días. Después de los correspondientes tiempos de exposición, los embriones se transfirieron al medio B5 modificado con el 50% de sus componentes y sin reguladores del crecimiento (B5 50%) (medio de proliferación) donde permanecieron 30 días.

Se realizaron subcultivos cada 15 días y en cada uno de ellos, los embriones se remojaron en la solución antioxidante durante 30 min.

### *Desarrollo de brotes adventicios*

Después de 30 días de incubación en el medio de proliferación, los embriones se transfirieron al medio Schenk y Hildebrandt (1972) modificado por Reilly y Washer (1977) SH, al 50% de sus componentes, sin reguladores del crecimiento (medio de maduración), adicionado con ácido ascórbico y ácido cítrico 250 mg l<sup>-1</sup> c/u y pH 5.7 (solución antioxidante), adicionada por filtración para su esterilización.

Como medida para evitar la oxidación, así como para fomentar el crecimiento y desarrollo de los brotes adventicios, los explantes se subcultivaron cada 15 días en este medio y en cada ocasión se enjuagaron 30 min en la solución antioxidante.

Los medios de proliferación y maduración se complementaron con 30 g·l<sup>-1</sup> de sacarosa, se gelificaron con Bacto Agar 8.5 g l<sup>-1</sup> y se ajustaron a un pH de 5.7 con KOH y HCl 0.1N. Se distribuyeron en frascos de boca ancha con capacidad de 120 ml, con 25 ml de medio en cada frasco. Todos los cultivos se incubaron a 26 ± 2°C, 16 horas, de 46 a 48 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con lámparas incandescentes "Phillips" de luz fría.

#### *Individualización de brotes adventicios*

Los brotes adventicios provenientes de los diferentes tratamientos y tiempos de exposición cuando fue posible se individualizaron con ayuda de un bisturí y pinzas y se subcultivaron cada 15 días durante seis meses en medio de maduración (SH50%), en cada subcultivo se les aplicó el enjuague con solución antioxidante durante 30 min.

#### *Pruebas de enraizamiento*

Los brotes que alcanzaron una altura de 5 a 8 mm se emplearon para realizar dos ensayos de enraizamiento.

1) Un lote de 30 brotes provenientes de diferentes tratamientos con BA/ANA se utilizaron para inducir el enraizamiento, se separaron en grupos de 10 y se enjuagaron en solución antioxidante durante 30 min para ser subcultivados en las siguientes condiciones:

a) en tubos de ensayo (25 x 150 mm) con medio SH50%, gelificado con agar-agar 5.5 g·l<sup>-1</sup> y adicionado con 3 mg·l<sup>-1</sup> de AIB,

b) en tubos de ensayo con una mezcla de suelo (tierra de hoja, tierra negra 1:1) esterilizada y humedecida con medio SH50% + 3 mg·l<sup>-1</sup> de AIB y

c) en puentes de papel filtro con medio líquido SH50% + 3 mg·l<sup>-1</sup> de AIB.

2) El segundo ensayo se llevó a cabo con 20 brotes provenientes de embriones sometidos al mejor tiempo de inducción ensayado y en las mejores concentraciones de kinetina. Los brotes se enjuagaron en la solución antioxidante durante 30 min y enseguida se colocaron en puentes de papel filtro con medio líquido SH50% y 25% de sacarosa durante 15 días.

La mitad del lote se transfirió a puentes con papel filtro con medio líquido SH50%, 25% de sacarosa adicionado con AIB ( $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), los 10 brotes restantes se colocaron en las mismas condiciones pero con AIB ( $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), en ambas concentraciones se realizaron ensayos proporcionando pulsos de 24 y 48 h.

Para ambos ensayos se eliminó previamente el tejido oxidado de la base de los brotes y se les realizó un corte para permitir un mejor contacto con el regulador de crecimiento. Al medio líquido SH50% adicionado con el AIB no se le añadió ácido ascórbico y ácido cítrico.

Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , con fotoperiodo de 16 h y  $40\text{-}47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  lámparas incandescentes "Phillips" de luz fría.

### *Análisis estadístico*

Al final del décimo subcultivo en medio SH50%, se evaluó el número promedio de brotes adventicios producidos por embrión, el porcentaje de embriones que formaron brotes, el total de brotes por embrión formados en los distintos tratamientos hormonales y tiempos de exposición. Todos los experimentos se realizaron por lo menos dos veces, con un mínimo de 12 explantes por tratamiento y por repetición.

Para detectar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en las variables de respuesta, se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias (LSD) de Fisher. Estos se llevaron a cabo con el paquete estadístico Statgraphics versión 5.0.

## ***Resultados y Discusión***

### ***Respuestas morfológicas***

A continuación se describen las respuestas morfológicas provenientes de todos los ensayos realizados en las pruebas de competencia morfológica, que se expresaron durante el segundo subcultivo en medio de proliferación (B5 50%). De manera general fue posible englobarlas de la siguiente forma:

- a) embriones sin respuesta
- b) oxidación de los embriones o de los brotes adventicios
- c) germinación incipiente de los embriones
- d) formación de meristemoides
- e) formación de primordios de brotes
- f) desarrollo de brotes adventicios

a) Los embriones que no presentaron respuesta, fue evaluada por la permanencia de color blanco en ellos, la escasez del incremento en su tamaño y la no turgencia en sus cotiledones.

Se observó que el 100% de los embriones no respondieron al ser sometidos a tiempos de inducción cortos de 1 a 5 días y luego ser transferidos al medio B5 50%, sin embargo cuando fueron expuestos más tiempo con el regulador del crecimiento tuvieron una respuesta morfológica del 50 al 25%. En las combinaciones ensayadas con K/2,4-D posteriormente de los 21 días de inducción este efecto quedó suprimido, en cambio en las combinaciones con BAVANA este efecto estuvo presente aún en los últimos tratamientos.

Entre el 85 y 100% de los embriones de *P. chihuahuana* expuestos durante los primeros cinco días a las diferentes concentraciones de auxinas/citocininas en el medio de inducción y después de quince días de incubación en medio B5 50% sin reguladores del crecimiento, no presentaron modificaciones aparentes. La omisión de las respuestas morfológicas en los embriones disminuyó del 25 al 50% a partir del decimocuarto día en el medio de inducción y la respuesta morfológica se incrementó, no obstante, la falta de respuesta ocurrió en tiempos de inducción entre 21, 24 y 30 días en porcentajes bajos (0-

20%). Aunque no se observaron cambios morfológicos evidentes, esto no significa que no se hayan iniciado diversos procesos. Existen reportes que demuestran los cambios que presentan los explantes al ser expuestos al regulador del crecimiento en diferentes tiempos de inducción (pulsos).

Un claro ejemplo es el trabajo que desarrollaron Villalobos *et al.* (1984), quienes utilizaron cotiledones de 3 a 5 mm de longitud a partir de semillas germinadas *in vitro* de *Pinus radiata*, los cotiledones se individualizaron y fueron cultivados tanto en medio SH sin regulador del crecimiento y en SH adicionado con BA (25  $\mu\text{M}$ , aprox. 5.7 mg l<sup>-1</sup>). Desde las primeras horas de cultivo se realizaron pruebas autoradiográficas incorporando marcadores como L-[4,5-<sup>3</sup>H(N)]-leucina, [metil-<sup>3</sup>H]-timidina, entre otros para determinar la cantidad de DNA, RNA y proteínas. Los explantes se fijaron y analizaron con microscopía electrónica.

Villalobos y sus colaboradores observaron que a los cinco días de incubación, los explantes presentaron modificaciones morfológicas, pero las autoradiografías mostraron que desde el tercer día de iniciado el cultivo la mayor cantidad de proteínas marcadas y la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina fue más evidente en los cotiledones que se cultivaron en presencia de la citocinina, que en aquellos que se cultivaron en medio carente del regulador, así mismo los marcadores se concentraron en el núcleo de las capas celulares epidérmicas y en la segunda y tercera capa subepidérmica al quinto día de cultivo. De esta forma se demostró que cambios bioquímicos y fisiológicos, se presentan desde que el explante está en sus primeras horas de cultivo que posteriormente se manifestarán o traducirán en cambios morfológicos macroscópicos y estructurales.

b) La oxidación fue un factor presente durante todo o la mayor parte de los experimentos, que limitó el desarrollo de los embriones y por lo tanto la formación de brotes adventicios. En los ensayos realizados con K/2,4-D el mayor porcentaje de oxidación se presentó entre los 1 y 9 días de inducción y con BA/ANA entre los 1 y 14 días, ambos en un intervalo del 100 al 50%.

Se observó que al incrementar el tiempo de exposición la oxidación disminuyó hasta un 25%, lo que permitió que los embriones continuaran con el desarrollo de los brotes adventicios. El decremento en el porcentaje de oxidación fue parcialmente controlado por la aplicación de la solución antioxidante tanto al medio de cultivo de maduración (SH50%) como por los enjuagues de la misma solución a los embriones, desde su siembra inicial y cada vez que se llevó a cabo el subcultivo. En las técnicas *in vitro* la oxidación

puede ocurrir como una respuesta a la excisión o puede presentarse posteriormente en el cultivo (Bonga y von Aderkas, 1992); se ha observado que al adicionar ácido ascórbico al medio previene la oxidación durante la formación de brotes adventicios de *Picea mariana* (Rumary y Thorpe, 1984, citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

Existen reportes como el de Harry y Thorpe (1994) que señalan que en *Pinus banksiana* al adicionar ácido ascórbico esterilizado por filtración al medio de cultivo así como carbón activado y polivinilpirrolidona a diferentes concentraciones antes de ser esterilizado, no se controló la oxidación en los explantes.

c) Otra de las manifestaciones que se presentaron fue la incipiente germinación de los embriones (10%). Se observó que sin reguladores del crecimiento los embriones germinaron esporádicamente pero no continuaron su desarrollo. Este se manifestó sólo escasamente en aquellos embriones que recibieron un tiempo de inducción de 3 días, (el crecimiento de la raíz, la elongación del hipocótilo y la permanencia de los cotiledones reducidos), y aunque se les proporcionaron subsecuentes subcultivos en medio fresco, sólo se logró el desarrollo normal de un embrión hasta plántula (Fig. 1) que posteriormente se necrosó.

d) y e) Las siguientes respuestas morfológicas evaluadas se presentaron en la superficie de los cotiledones que mostraron un aspecto rugoso e irregular y que posteriormente conformaron agrupaciones nodulares (meristemoides), compuestas por un nódulo central rodeado de numerosas prolongaciones a manera de pequeñas hojas que se diferenciaron en primordios de brote (Fig. 2).

Este aspecto rugoso se manifestó a los 15 días en el medio de proliferación (B5 50%), en aquellos embriones que fueron expuestos mínimo 11 días con K/2,4-D y 17 días con BA/ANA. Comparando con embriones de *Picea abies*, este aspecto nodular se manifestó a las dos semanas de incubación en medio sin



Fig. 1 Plántula proveniente de un embrión germinado con 3 días de inducción.

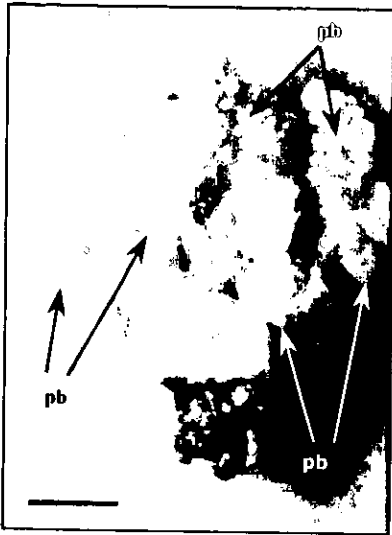


Fig. 2 Embrión de *Picea chihuahuana* después de 24 días de inducción. Se observan los primordios de brotes (pb) en los cotiledones. Escala = 1 mm.

reguladores de crecimiento, previamente inducidos con BA  $250\mu\text{M}$  (ca.  $56.17\text{ mg l}^{-1}$ ) (von Arnold y Eriksson, 1985) y en *Pinus banksiana* los primordios se observaron a la tercera semana de cultivo en medio adicionado con BA entre  $5$  y  $29\mu\text{M}$  (ca.  $1.12$  y  $6.5\text{ mg l}^{-1}$ ) (Chesick y Bergman, 1991).

Montes (1993) señaló que en los cotiledones de embriones de *P. chihuahuana* se observaron los primordios meristemáticos a la cuarta semana de incubación en medio MS adicionado con ANA  $0.2\text{ mg l}^{-1}$  en combinación con BA  $5\text{ mg l}^{-1}$ .

La consolidación y desarrollo de uno a más brotes **adventicios** en las diferentes proporciones de citocininas/auxinas y los tiempos de inducción ensayados, se manifestaron en mayor o menor número después de transferir los explantes del medio de proliferación (B5 50% sin reguladores del crecimiento) al medio de maduración (SH50% sin reguladores del crecimiento) y realizando subcultivos cada 15 días durante seis meses (Fig. 3).

En el trabajo realizado por von Arnold y Eriksson (1985) observaron que el desarrollo de los primordios de brote y brotes adventicios en *Picea abies*, se presentó a la tercera y cuarta semana en medio sin reguladores de crecimiento y Montes (1993) determinó que en embriones de *P. chihuahuana* posteriormente de ser subcultivados en medio GD50% sin



Fig. 3 Consolidación y desarrollo de los brotes adventicios (ba) de *Picea chihuahuana*. Escala = 1 mm.

hormonas, se desarrollaron los brotes después de 4 semanas de incubación y alcanzaron una longitud de 3 mm.

#### *Desarrollo de brotes adventicios*

Se observó que los brotes no siempre provinieron de aquellas combinaciones y tiempos de inducción en los que se obtuvo un mayor número de primordios, sino que se formaron después de haber sido subcultivados cada 15 días, (Fig. 4), así mismo algunos primordios no lograron desarrollarse en brotes



Fig. 4 Desarrollo y elongación de brotes adventicios (ba) después de consecutivos subcultivos cada 15 días.  
Escala = 3 mm.

completos debido a que se oxidaron y necrosaron.

Fue posible observar que el desarrollo de los brotes en *P. chihuahuana* fue asincrónico, evento que reporta también Schwarz *et al.* (1991) en *Pinus oocarpa*, donde la elongación de los brotes se presentó rápidamente y de manera asincrónica durante la sexta y décima semana de cultivo.

En el presente trabajo se contabilizó el número total de brotes adventicios que se generaron por cada embrión sembrado, por tratamiento y tiempo de inducción, en ocasiones esto no fue posible debido que al realizar los subcultivos y los enjuagues correspondientes los brotes se disgregaban y no se logró determinar a qué explante inicial pertenecían.

En la Tabla 4 se puede analizar el número de brotes generados por tratamiento y el tiempo de inducción con las diferentes combinaciones de K/2,4-D. El mayor número de brotes se formó a los 24, 21 y 30 días de exposición con 551, 450 y 325 brotes en total respectivamente. Con relación a los mejores tratamientos hormonales, independientemente del tiempo de inducción el mayor número de brotes se presentó en las combinaciones 5/0 mg·l<sup>-1</sup> con 659, 3/0 mg·l<sup>-1</sup> con 431 y 3/1 (336).



Tabla 4.-Número brotes adventicios provenientes de diferentes concentraciones de K/2,4-D y tiempos de inducción. Desarrollados después de seis meses de incubación en medio de maduración (SH50% y sin reguladores del crecimiento).

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)						Total
	11	14	17	21	24	30	
0/1	0	0	0	0	0	0	0
1/1	21	12	20	44	0	0	97
2/1	32	0	44	61	91	0	228
3/0	0	52	63	77	134	105	431
3/1	0	73	56	56	93	58	336
4/1	76	36	0	44	0	28	184
5/0	50	93	101	124	165	126	659
5/1	32	4	0	16	20	8	80
5/4	0	0	28	28	0	0	56
2/2	0	8	0	0	48	0	56
Total	211	278	312	450	551	325	

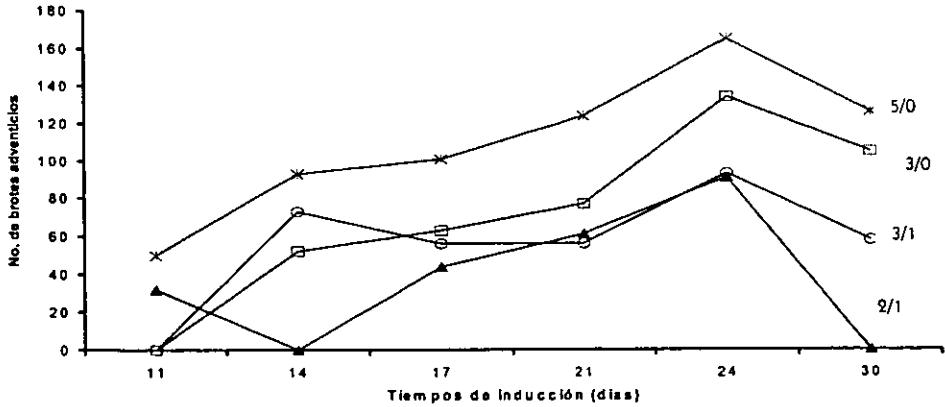
En los ensayos realizados con BA/ANA (Tabla 5), el mayor número de primordios de brote total generados se presentó en los tiempos de exposición de 24 y 30 días con 393 y 376 brotes respectivamente y las concentraciones que promovieron el mayor número de brotes, independientemente del tiempo de exposición fueron 5/0 mg·l<sup>-1</sup> con 339 y 3/0 mg·l<sup>-1</sup> con 284 brotes, seguidos de 3/1 (178) y 2/1 (174). von Arnold y Tillberg (1987) indicaron que el número de brotes adventicios a partir de yemas adventicias de *Picea abies* varió de 2 a 50, pero usualmente solo de 10 a 20 se desarrollaron en brotes.

Tabla 5. Número de brotes adventicios provenientes de diferentes concentraciones de BAVANA y tiempos de inducción. Desarrollados después de seis meses de incubación en medio de maduración (SH50% y sin reguladores del crecimiento).

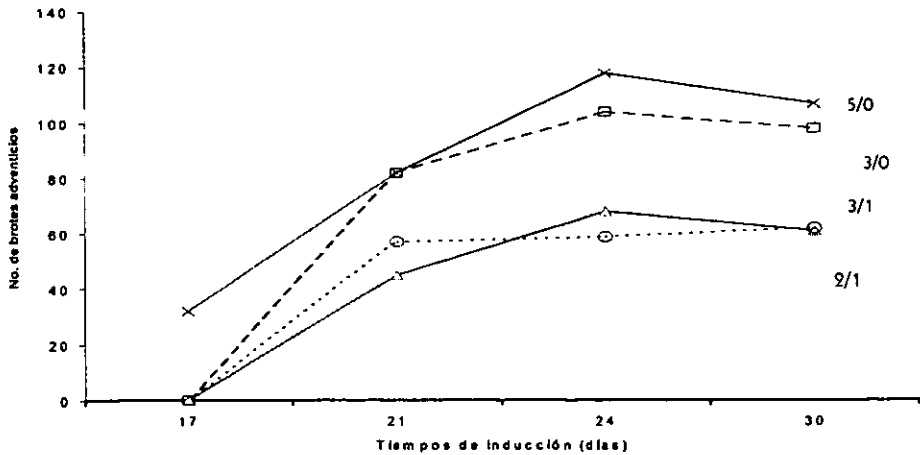
BAVANA (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)				Total
	17	21	24	30	
0/1	36	0	0	0	36
1/1	0	0	12	24	38
2/1	0	45	68	61	174
3/0	0	82	104	98	284
3/1	0	57	59	62	178
4/1	11	0	32	12	55
5/0	32	82	118	107	339
5/1	0	12	0	12	24
5/4	0	0	0	0	0
2/2	0	0	0	0	0
Total	79	278	393	376	

En las Gráficas 1 y 2 se observa el comportamiento de las mejores combinaciones de reguladores del crecimiento/ tiempos de inducción para K/2,4-D y BAVANA respectivamente. En K/2,4-D es particularmente significativo que en el tiempo de inducción de 24 días, se presentaron los puntos más altos de brotes adventicios en las cuatro combinaciones y posteriormente hay un decremento de los mismos. Lo mismo sucedió en BAVANA, a excepción de la combinación 2/1 el decremento en el número de brotes no es tan pronunciado como en K/2,4-D, sino una tendencia de estabilización.

Gráfica 1. Número de brotes adventicios generados en los mejores tratamientos de K/2,4-D expuestos a diferentes tiempos de inducción.



Gráfica 2. Número de brotes adventicios generados en los mejores tratamientos de BA/ANA expuestos a diferentes tiempos de inducción.



El efecto que presenta el regulador de crecimiento (BA) en la formación de brotes adventicios ha sido estudiado por von Arnold y Tillberg (1987) en yemas vegetativas de *Picea abies*, sus resultados muestran que en el tratamiento de 250  $\mu\text{M}$  de BA durante 3 h de inducción fue el que generó más brotes adventicios y reportan un comportamiento similar al que se presentó en este trabajo para *Picea chihuahuana* (Gráfica 1).

Las autoras concluyen que después de una prolongada exposición a la citocinina la producción de brotes adventicios decrece, lo cual concuerda con lo descrito para *P. chihuahuana*.

**Análisis estadístico**

En las Tablas 6 y 7 se reportan los mejores tratamientos ensayados en donde se obtuvo, el total de brotes por tratamiento y el promedio de brotes adventicios con K/2,4-D y BA/ANA. En los tratamientos de K/2,4-D el número de brotes que se generaron fue mayor y el tiempo mínimo de inducción requerido fue de 14 días, el mayor número de brotes por embrión se presentó en las combinaciones 3/0 con 134 brotes con 24 días de inducción y en la combinación 5/0 con más de 100 brotes por tratamiento/tiempo de inducción, con un rango de 5 a 6 brotes promedio por embrión (Tabla 6).

Tabla 6. Número de brotes adventicios procedentes de embriones maduros de *Picea chihuahuana* expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en medio B5 adicionado con K/2,4-D y subcultivados en medio SH50%. Resultados después de seis meses.

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (días)	Embriones con brotes (%)	Total de brotes/tratamiento	Promedio de brotes/embrión ± DS
3/0	14	75	52	2.16 ± 1.43
	17	72	63	2.62 ± 1.95
	21	87	77	3.20 ± 1.93
	24	83	134	5.58 ± 3.80
	30	91	105	4.37 ± 3.59
3/1	14	66	73	3.04 ± 2.80
	17	70	54	2.25 ± 1.84
	21	66	56	2.33 ± 1.99
	24	79	93	3.87 ± 2.60
	30	75	58	2.41 ± 1.81
2/1	14	0	0	0
	17	50	44	1.83 ± 2.09
	21	62	61	2.54 ± 2.41
	24	83	91	3.79 ± 2.53
	30	0	0	0
5/0	14	83	93	3.87 ± 2.30
	17	83	101	4.20 ± 2.57
	21	87	124	5.16 ± 3.19
	24	95	165	6.87 ± 3.67
	30	87	126	5.25 ± 3.65

En los tratamientos con BA/ANA (Tabla 7) el tiempo mínimo de exposición en medio de inducción fue de 21 días excepto en 5/0 y el mayor número de brotes desarrollados por embrión se presentó en 3/0 (4.33) con 24 días de inducción y 5/0 (4.45, 4.91) a 30 y 24 días respectivamente; la frecuencia de brotes en estos tratamientos fue menor con respecto a K/2,4-D.

Tabla 7. Número de brotes adventicios procedentes de embriones maduros de *Picea chihuahuana* expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en medio B5 adicionado con BA/ANA y subcultivados en medio SH50%. Resultados después de seis meses.

BA/ANA (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (días)	Embriones con brotes (%)	Total de brotes/tratamiento	Promedio de brotes/embrión ± DS
3/0	17	0	0	0
	21	58	82	3.41 ± 3.43
	24	95	104	4.33 ± 1.94
	30	87	98	4.08 ± 2.35
2/1	17	0	0	0
	21	50	45	1.87 ± 2.13
	24	79	68	2.83 ± 2.16
	30	75	61	2.54 ± 1.76
3/1	17	0	0	0
	21	79	57	2.37 ± 1.86
	24	79	59	2.45 ± 1.99
	30	83	62	2.58 ± 1.81
5/0	17	50	32	1.33 ± 1.60
	21	75	82	3.41 ± 2.51
	24	87	118	4.91 ± 2.44
	30	87	107	4.45 ± 2.24

En ambas tablas se observó que en la mayoría de las combinaciones el número de brotes por embrión decreció después de los 24 días, a pesar de que estos se subcultivaron y se aplicó la solución antioxidante tanto en el medio de cultivo como en los baños previos a cada transferencia, los brotes se oxidaron, no continuaron su desarrollo y finalmente murieron.

El promedio de brotes por tratamiento y tiempo de inducción ensayados, independientemente del embrión de origen fue de 1 a 5 brotes por embrión para ambos juegos hormonales, con una mayor frecuencia en los tratamientos de K/2,4-D que en BA/ANA.

Montes (1996) reportó la formación de 6 brotes por embrión de *P. chihuahuana* después de cuatro semanas de incubación en medio GD50% basal y Kolevska y Buturović (1995), reportaron la formación de brotes adventicios en *Picea omarika* en diferentes combinaciones de citocininas y auxinas, obtuvieron de 4.2 a 9.4 brotes promedio por embrión en los tratamientos con BA y de 7.8 brotes promedio por embrión con kinetina. El número de brotes de *P. omarika* fue mayor al de este trabajo y concuerdan con los reportados por Montes.

Se aplicó un modelo al análisis estadístico que examinó el efecto del tratamiento y el tiempo de exposición en el número de embriones que formaron primordios de brote y el total de brotes formados. La hipótesis nula que se planteó, fue que no existían diferencias significativas en el número de primordios de brotes formados con respecto a los tratamientos de fitorreguladores y el tiempo de exposición empleados.

Al analizar estadísticamente los datos de K/2,4-D (Tabla 8) se observó que se presentaron diferencias significativas en las dos condiciones ensayadas (tiempos de inducción y reguladores del crecimiento), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula, es decir si existe un efecto de estas condiciones en la formación de los brotes adventicios.

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable respuesta del número de primordios de brotes adventicios de *Picea chihuahuana* con respecto a los tiempos de inducción y tratamientos hormonales de K/2,4-D.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Tiempos de inducción	4	181.85255	45.46314	6.854	.0000
Tratamientos	3	817.97992	272.65997	41.104	.0000
Residual	432	2865.6631	6.6334794		
Total corregido	439	3869.7977			

Se aplicó la prueba múltiple de comparación de medias (LSD) de Fisher. En esta prueba (Tabla 9) el tratamiento 5/0 fue el que presentó la mayor diferencia significativa, seguido de 3/0 y 3/1. Para los tiempos de inducción (Tabla 10), el tiempo de inducción de 21 días fue estadísticamente significativo. Por lo tanto sí hay efecto de la combinación de reguladores de crecimiento y el tiempo de inducción aplicado en el número de primordios de brote generados.

Tabla 9. Análisis de rango múltiple para los diferentes tratamientos de K/2, 4-D a embriones maduros de *Picea chihuahuana*.

Tratamientos	Medias	Grupos homogéneos
2/1	1.7545	X
3/1	3.1200	X
3/0	3.9818	X
5/0	5.5036	X

Tabla 10. Análisis de rango múltiple para los diferentes tiempos de inducción en los tratamientos de K/2, 4-D a embriones maduros de *Picea chihuahuana*.

Tiempo de inducción (días)	Medias	Grupos homogéneos
30	2.6931	X
24	3.443	XX
17	3.454	XX
14	3.672	X
21	4.686	X

Para la serie de experimentos realizados con BA/ANA se aplicó el mismo análisis estadístico y se encontraron diferencias significativas en los tratamientos, pero no en los tiempos de inducción, el tratamiento 5/0 fue el que mostró esta diferencia.

Los resultados muestran un efecto significativo en los embriones de *P. chihuahuana* sometidos a los diferentes tratamientos con Kinetina sola o con bajas concentraciones de 2, 4-D.

Esta respuesta es similar a la reportada por von Arnold (1982) citado por Kolevska y Buturović (1995), donde mencionan que se obtuvo una alta tasa de brotes formados cuando los embriones fueron colocados en medio de inducción adicionado con kinetina. Así mismo el desarrollo de los brotes adventicios fue más vigoroso que aquellos obtenidos con BA/ANA.

#### *Individualización de brotes adventicios*

Durante el desarrollo asincrónico de los brotes adventicios en ambos juegos de citocininas/auxinas, se observó que en aquellas combinaciones donde se manifestó inicialmente un menor número de primordios presentaron un mayor desarrollo de brotes adventicios; en aquellos cultivos en donde se presentó un mayor número de primordios, frecuentemente no desarrollaron la misma cantidad de brotes debido a que existe probablemente una competencia entre ellos por el espacio y nutrientes.

Así mismo es importante señalar, que los cultivos que presentaron primordios y no lograron desarrollarse en brotes completos fue debido también a que la mayoría se necrosaron y oxidaron o permanecieron con una altura inferior a los 3 mm.

En las Tablas 11 y 12 se muestran el número de brotes adventicios procedentes de los diferentes tratamientos y tiempos de exposición ensayados que se lograron individualizar.

El mayor número de brotes individualizados con K/2,4-D (Tabla 11), se obtuvo de las combinaciones 3/0 en los tiempos de inducción de 17 días (10 brotes) y 21 días (9 brotes) así como en la combinación 3/1 en el intervalo de 14 a 24 días de inducción donde se obtuvieron de 2 a 5 brotes.

Tabla 11. Brotes adventicios individualizados generados por tratamiento a partir de embriones de *Picea chihuahuana*, sometidos a diferentes tiempos de inducción y concentraciones de K/2,4-D, subcultivados cada 15 días en medio de maduración (SH50%, sin reguladores del crecimiento).

K/2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)											Total
	1	3	5	7	9	11	14	17	21	24	30	
0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1/1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3
2/1	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7
3/0	0	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	19
3/1	0	0	0	0	0	0	5	3	4	2	0	14
4/1	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0	9
5/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6
5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	5
5/4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
2/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5
Total	0	0	0	0	0	13	9	15	17	16	1	

Con BAVANA (Tabla 12) el mayor número de brotes individualizados (37) se obtuvo en 6 de los 10 tratamientos hormonales ensayados sometidos a una inducción de 24 días.



Tabla 12. Brotes adventicios individualizados generados por tratamiento a partir de embriones de *Picea chihuahuana*, sometidos a diferentes tiempos de inducción y concentraciones de BAVANA, subcultivados cada 15 días en medio de maduración (SH50%, sin reguladores del crecimiento).

BAVANA (mg.l <sup>-1</sup> )	Tiempo de inducción (días)											
	1	3	5	7	9	11	14	17	21	24	30	Total
0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3
2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
3/0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	3	6	18
3/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6
5/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	9	37	8	

Finalmente, el número de brotes adventicios que se logró individualizar para continuar su desarrollo fue pequeño en comparación al número de primordios de brotes que se manifestaron inicialmente. Algo similar fue reportado en *Pinus radiata* donde se contaba inicialmente con 10 a 30 brotes formados por embrión y solo 2 o 3 lograron su elongación (Thorpe y Biondi, 1984).

La literatura señala que en etapas tempranas de la formación de brotes adventicios, la subdivisión de los meristemoides es favorable para incrementar el número de brotes, en *Pinus radiata* el explante usualmente es subdividido alrededor de la novena semana cuando un gran número de brotes crecen en el explante y pueden inhibir su crecimiento y desarrollo (Aitken *et al.*, 1981 citado por Thorpe y Biondi, 1984).

Debido al desarrollo asincrónico de los brotes en *P. chihuahuana*, fue necesario separar manualmente con la ayuda de un bisturí, aquellos que presentaban una talla mayor de aquellos que iniciaban su desarrollo, para evitar de este modo la inhibición de su crecimiento. Fue posible en algunos casos realizar la individualización de los brotes con la finalidad de que aquellos menores de 3 mm pudieran desarrollarse de igual forma, pero desafortunadamente éstos no continuaron su desarrollo, permanecieron con una talla pequeña o se oxidaron. El número de brotes individualizados que se obtuvo a lo largo de los subcultivos fue disminuyendo por la persistente oxidación y la ocasional contaminación por bacterias (5%).

Para obtener un número suficiente de brotes y llevar a cabo las pruebas de enraizamiento se sembraron embriones en los mejores tratamientos con K/2,4-D (Tabla 13). En ambas combinaciones el número de brotes adventicios obtenidos fue 5.38 y de 6.92 para las concentraciones de 3 y 5 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina respectivamente.

Resultados similares son reportados por Kolevska y Buturović (1995), donde el promedio de brotes formados por embrión fue de 7.8 en medio adicionado con kinetina (10 µM) + ANA (0.05 µM) + AIB (0.05µM) (ca. 46+0.0093+0.01 mg l<sup>-1</sup>), aunque para su estudio BA resultó ser más eficiente con 9.4 ± 0.2 para la formación de brotes en *Picea omorika*.

De los resultados obtenidos para *P. chihuahuana* se aplicó el análisis de varianza para determinar si hay diferencias significativas entre los dos tipos de reguladores y se determinó que la concentración 5 mg.l<sup>-1</sup> denota dicha diferencia.

Tabla 13. Número de brotes adventicios obtenidos a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*, colocados en los mejores tratamientos de K/2,4-D durante 24 días de inducción y subcultivados a medio SH50% sin reguladores del crecimiento cada 15 días. Resultados a los cuatro meses.

K/2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	Embriones Sembrados <sup>1</sup>	Embriones con brotes (%)	Total de brotes	Brotos formados por tratamiento (x ± DS)
3/0	10 x 5	98	269	5.38 ± 2.88 a
5/0	10 x 5	100	346	6.92 ± 3.45 b

<sup>1</sup> 10 explantes por experimento repetido 5 veces

Letras diferentes indican diferencias significativas para p > 0.05.

### Pruebas de enraizamiento

Un importante paso o fase dentro de la micropropagación *in vitro* es obtener plantas completas. En pruebas preliminares realizadas se utilizaron brotes de 3 y 4 mm provenientes de embriones de los diferentes tratamientos de K/2,4-D que se colocaron en medio B5 50% líquido adicionado con AIB (5 y 10 mg l<sup>-1</sup>)

combinado con ANA (9 y 18 mg l<sup>-1</sup>), se desarrolló callo en la base del brote que probablemente no permitió la regeneración de raíces, así mismo la oxidación afectó severamente un 60% del número total de brotes individualizados. Estas respuestas pudieron ser ocasionadas por: a) la enérgica acción de la combinación de AIB/ANA, b) por la pequeña talla de los brotes o c) su estado fisiológico.

Montes (1993) reportó que empleó brotes de 15 a 20 mm de *P. chihuahuana*, los cuales colocó en medio GD50% basal adicionado con 20 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 g l<sup>-1</sup> de carbón activado complementado con ABA 0.1, AIB 1.0 o BA 0.5 mg l<sup>-1</sup> y obtuvo la regeneración de raíces pero no especifica en que porcentaje.

Así mismo se ha reportado que en *Pinus oocarpa* que los brotes de 1 cm de altura tuvieron mejor éxito que aquellos con una talla de 5 mm (Schwarz *et al.*, 1991).

Por lo anteriormente citado se seleccionaron brotes con una altura de 5 a 7 mm para las pruebas de enraizamiento, En los ensayos realizados con brotes provenientes de los tratamientos con BA/ANA, se observó que aquellos que se subcultivaron en medio SH50% con agar-agar no progresaron, no se elongaron, ni desarrollaron raíces, el 40% se oxidó o se decoloró tornándose amarillo.

Los brotes que se colocaron en suelo humedecido con SH50% no prosperaron y todos se necrosaron por oxidación; sólo aquellos que se subcultivaron en puentes de papel filtro se elongaron y permanecieron de color verde (37%), el 30% se tornó de color amarillo y el 25% presentó áreas pardas (oxidación) pero ninguno generó raíces.

En coníferas el enraizamiento espontáneo *in vitro* es muy raro y es difícil comparado con las angiospermas. Se ha reportado que menos del 5% de coníferas regeneradas *in vitro* desarrollaron espontáneamente raíces (Mohammed y Vidaver, 1988) y en *Pinus pinaster* (Calixto y Pais, 1997) la formación de raíces espontáneamente se presentó después de 5 a 6 meses de cultivo en el medio de elongación carente de reguladores del crecimiento. En este trabajo no se presentó la regeneración espontánea de raíces en *P. chihuahuana*.

Como ya se mencionó, el enraizamiento en condiciones *in vitro* se promueve modificando las concentraciones y realizando combinaciones con las auxinas, los brotes son colocados a diferentes tiempos de

exposición (pulsos) en soluciones acuosas. Como lo señalan Kolevska y Buturović (1995) en *Picea omorika* fue posible después de varios ensayos inducir raíces en el 12% de los brotes; el mejor tratamiento fue cuando adicionaron al medio  $10 \mu\text{M}$  (ca.  $2.04 \text{ mg l}^{-1}$ ) de AIB.



Fig. 5. Brote adventicio de *Picea chihuahuana* que generó una raíz (izquierda). Detalle de la raíz adventicia con delgadas vellosidades (derecha). Escala(a) = 05 mm; Escala(b) = 3 mm.

El segundo bloque de pruebas de enraizamiento en *P. chihuahuana* se realizó con brotes provenientes de embriones sometidos al mejor tiempo de inducción ensayado (24 días) y con las mejores concentraciones de 3 y  $5 \text{ mg l}^{-1}$  de kinetina. De todos los ensayos que se realizaron solamente un brote desarrolló raíz (Fig. 5a), esta fue obtenida directamente del brote el cual fue expuesto al AIB ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) con un pulso de 48 h, después de dos meses en medio SH50% líquido se observó el desarrollo de la raíz que alcanzó 15 mm de longitud con delgadas prolongaciones a todo lo largo (Fig. 5b).

La regeneración de raíces ha sido reportada en otras especies como *Pinus eldarica* donde se colocaron 100 brotes en tratamiento con ANA y sólo uno formó la raíz adventicia (Gladfelter y Philips, 1984).

El presente estudio aunado a los ensayos realizados por Montes en 1993, son de las pocas evidencias del enraizamiento *in vitro* obtenido para esta especie.

### *Conclusiones*

La ausencia de respuesta fue mayor en tiempos cortos de inducción y se presentó mayor respuesta morfogénica cuando se incrementó el tiempo de inducción.

Los embriones cigóticos de esta especie requieren prolongados tiempos de inducción o exposición a los fitorreguladores para manifestar cambios aparentes.

La aplicación de los enjuagues con la solución antioxidante permitió el desarrollo de los primordios de brote y brotes adventicios.

La germinación *in vitro* puede ser inducida al aplicar un pulso mínimo de 3 días.

El desarrollo de los brotes adventicios se promovió en subsecuentes subcultivos en medio libre de hormonas

Los cultivos tratados con K/2,4-D promovieron la formación de brotes en un mayor rango de tiempos de inducción (11 a 30 días) en contraste con BA/ANA (21 a 30 días).

El incremento en el tiempo de exposición de los reguladores de crecimiento y la adecuada combinación y concentración de reguladores del crecimiento, permitieron que los embriones pudieran iniciar y consolidar las diversas respuestas morfogénicas.

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos y en los tiempos de inducción ensayados en K/2,4-D, sin embargo no se presentaron diferencias significativas en los ensayos con BA/ANA.

Se obtuvo un mayor número de brotes adventicios en los embriones que se expusieron a los tratamientos con K/2,4-D que con BA/ANA.

Para promover la rizogénesis es conveniente que los brotes alcancen una altura mínima de 5 a 7 mm

El mejor sustrato para la sobrevivencia de los brotes y ensayos de enraizamiento fue el puente de papel filtro humedecido con medio de cultivo.

En *Picea chihuahuana* no ocurrió la generación espontánea de raíces.

Solo se generó una raíz adventicia proveniente de un brote adventicio expuesto con  $5 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB con un pulso de 48 hrs.

**Bibliografía**

- Afele JC, Saxena PK. 1995. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds.) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 3, pp 99-109, Kluwer Academic Publisher.
- Attree SH, Fowke LC. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, pp 423-445. Hi-Tech and Micropropagation. Springer, Berlin.
- Attree, SM, Fowke LC. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35:1-35.
- Ball, EA. 1987. Tissue culture multiplication of *Sequoia*. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds.). Cell and tissue culture in forestry, Vol. 3. pp.146-158. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Blazková A, Sotta B, Tranvan H, Maldiney R, Bonnet M, Einhorn J, Kerhoas L, Miginiac E. 1997. Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervirens*. *Physiologia Plantarum* 99:73-80.
- Bonga JM, von Aderkas P. 1992. *In vitro* culture trees. Kluwer Academic Press. Netherlands p. 236
- Bozhkov PV, Mikhlina SB, Shiryayeva GA. 1993. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst) somatic polyembryogenesis: high frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *J. Plant. Physiol.* 142: 735-741.
- Budimir S, Vujičić R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Panic) Purk. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 31:89-94.
- Calixto F, Pais MS. 1997. Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Aiton. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant* 33:119-124.
- Chaparro C. 1992. Factibilidad de la propagación *in vitro* de *Picea chihuahuana*. Tesis Ingeniero Agrónomo Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Delicias Chihuahua. 99 p.
- Chávez VM, Litz RE, Moon PA, Norstog DK. 1992a, Somatic Embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:59-63.
- Chávez. VM, Litz RE, Norstog DK. 1992b. In vitro Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:93-98.
- Chávez VM, Litz RE, Norstog K. 1992c. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:99-105.
- Cheah, K-T, Cheng T-Y. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured douglas fir cotyledon. *Amer. J. Bot.* 65(8): 845-849.
- Chesick EE, Bergmann BA. 1991. Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.). In: Bajaj YPS (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 16, 241-253. Spriger-Verlag, Berlin.

- Drake PM, John WA, Power JB, Davey MR. 1997. Cytokinin pulse mediated shoot organogenesis from cotyledons of stika spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency *in vitro* rooting of shoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50:147-151.
- Ellis DD, Bilderback E. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 76(3):348-355.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- García-Ferriz L, Serrano L, Pardos JA. 1994. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:135-140.
- Gladfelther HJ, Phillips GC. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Rept.* 6: 163-166.
- González MV, Rey M, Tavazza R, La Malfa S, Cuzzo L, Ancora G. 1998. *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *HortScience* 33(4):749-750.
- Gresshoff P, Doy C 1972 Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107.161-170.
- Harry IS, Thorpe TA. 1991. Engelmann Spruce (*Picea engelmannii* Parry ex Engelm.). In: Bajaj YPS (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16. pp. 408-422. Springer-Verlag Berlin.
- Harry IS, Thorpe TA. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of Jack pine. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.* 37:159-164.
- Jacob CV. 1994. Estudio isoenzimático de la variación genética en poblaciones naturales de *Picea chihuahuana*, en los estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León. Tesis Licenciatura. ENEP-Iztacala, UNAM. 114 p.
- Jain S, Gupta P, Newton R. 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publisher. 350 p.
- Kolevska-Pletikapić B, Buturović-Derić Z. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plant via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41: 189-192.
- Lesney MS. 1991. Slash Pine (*Pinus elliottii* Engelm.) In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees III* Vol. 16. pp 288 – 303. Springer-Verlag, Berlin,
- Lu Ch Y, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA. 1991. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Bot. Gaz.* 152:42-50.
- Mathur G. Nadgouda R. 1999. *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. *Plant Cell Rep.* 19:74-80.
- Mehra-Palta A, Sheltzer RH, Mott RL. 1978. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. *TAPPIJ* 61:37-40.
- Mohammed GH, Vidaver WE. 1988. Root production and plantlet development in tissue –cultured conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14:137-160.

- Montes RG. 1993. Guía metodológica para cultivar *in vitro* *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii*. Instituto Tecnológico Forestal No. 1., SEP, Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. El Salto, P. N., Durango. 32 p.
- Phillips GC, Gladfelter HJ. 1991. Eldarica Pine, Afghan Pine (*Pinus eldarica* Medw.) *In*: Bajaj YPS, (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees III Vol. 16. pp 269-287. Springer-Verlag, Berlin.
- Reilly K, Washer J. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plantlet formation from embryonic tissue. NZL For. Sci. 7(2):199-206.
- Ruaud, JN. 1993. Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56 days-old *Picea abies*. Plant Science. 92: 213-220.
- Rumary C, Patel KR, Thorpe TA. 1986. Plantlet formation in black and white spruce. II. Histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. Can. J. Bot. 64: 997-1002.
- Schenk RU, Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.
- Schwarz OJ, Beaty RM, Franco EO. 1991, Egg.cone Pine (*Pinus oocarpa* Schiede) *In*: Bajaj, YPS (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees III Vol.16. pp 304-316. Springer-Verlag, Berlin.
- Sommer H, Brown CL. 1975. Application of Tissue Culture to Forest Tree Improvement *In*: Sharp, WR, Larsen PO, Paddock EF, Raghnenen V. (eds.). Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications. pp 461-491.
- Thompson, DG. 1984. Clonal reforestation: forests of the future? *In*: Duryea, ML, Brown, GN. (eds.). Seedling physiology and reforestation success. Nijhoff Publishers. pp 3-28.
- Thorpe TA, Biondi S. 1984. Fiber and Wood. Chapter 16. Conifers. *In*: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y. (eds). Handbook of plant cell culture, Crop-Science., Vol. 2. pp 435-503. McMillan Publisher, New York
- Thorpe TA, Kumar PP. 1993. Cellular control of morphogenesis. *In*: Ahuja MR (ed.). Micropropagation of Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 11-29.
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP. 1991. Application of micropropagation to forestry. *In*: Debergh PC, Zimmerman RH. (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp.311-336.
- Tremblay FM. 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seeds of *Picea glauca*. Can. J. Bot. 68:236-242.
- Tremblay L, Tremblay LM. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 27:95-103.
- Villalobos VM. 1983. The early events associated with organogénesis in cultured radiata pine cotyledons. Tesis Doctoral. Universidad de Calgary, Alberta. 154 p.



- Villalobos VM, Leung DWM, Thorpe TA. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61:497-504.
- von Arnold S, Eriksson T. 1979. Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. *Plant Science Letters*, 15: 363-372.
- von Arnold S, Eriksson T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874.
- von Arnold S, Eriksson T. 1985. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 64: 41-47.
- von Arnold S, Tillberg E. 1987. The influence of cytokinin pulse treatment on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9:253-261.
- von Arnold S, Wallin A. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. Newsletter IAPTC No. 56:2-13.
- Wagley LM, Gladfelter HJ, Phillips G. 1987. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. *in vitro* II. Macro- and micro-photographic evidence of *de novo* regeneration. *Plant Cell Rep.* 66: 167- 171.

*Introducción*

En muchos sistemas experimentales, se desconoce aún la regulación y coordinación de los eventos que se manifiestan en etapas tempranas durante la diferenciación de órganos *in vitro*. Lo que está establecido es que entre los diferentes reguladores del crecimiento que se emplean, las citocininas estimulan la producción de brotes adventicios dependiendo entre otros muchos factores, de la concentración que se utilice, el tipo y la fisiología del explante inicial y de la especie, por lo que los cambios estructurales que se dan durante la organogénesis en los cultivos *in vitro* son por sí mismos una manifestación de diferentes procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos (Thorpe, 1980 citado por Patel y Berlyn, 1983) y para poder comprenderlos es necesario estudiarlos en diferentes etapas durante la iniciación, desarrollo y formación de los brotes adventicios (von Arnold y Eriksson, 1985). En coníferas se han generado en este campo diversas investigaciones, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Investigaciones realizadas en coníferas sobre la ontogenia y desarrollo de brotes adventicios *in vitro*.

Género y especie	Referencias
<i>Picea</i>	
<i>Picea abies</i>	Jansson y Bornman, 1981
<i>P. glauca</i>	von Arnold y Eriksson, 1985
<i>P. mariana</i>	Rumary, Patel y Thorpe, 1986
<i>Pinus</i>	
<i>Pinus coulteri</i>	Patel y Berlyn, 1983
<i>P. eldarica</i>	Wagley <i>et al.</i> , 1987
<i>P. radiata</i>	Villalobos <i>et al.</i> , 1985
<i>P. strobus</i>	Flinn <i>et al.</i> , 1988
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Cheah y Cheng, 1978 Kirby y Schalk, 1982

*Estudio de la competencia morfogénica*

Como ya se ha definido anteriormente, la competencia morfogénica es la habilidad del tejido a responder a la inducción morfogénica (organogénica o embriogénica), respuesta que puede seguir dos vías: que las células la hayan adquirido por un desarrollo autónomo o bien, cuando reciben una señal apropiada, la cual puede ser ambiental o química (Flinn *et al.*, 1988; Ellis y Bilderback, 1989;

Lyndon, 1990). Para comprender los procesos de diferenciación de los brotes adventicios es necesario investigar las diferentes etapas previas a su desarrollo (von Arnold y Eriksson, 1985).

Entre los trabajos en coníferas que abordan este tema están los realizados en: *Pinus ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989), *Pinus coulteri* (Patel y Berlyn, 1983), *Pinus radiata* (Villalobos, 1983; Villalobos *et al.*, 1985) y *Pinus strobus* (Flinn *et al.*, 1988) donde los autores determinaron periodos específicos de inducción en los explantes expuestos a los reguladores del crecimiento y evaluaron por medio de cortes histológicos auxiliados con microscopía electrónica y de barrido los eventos previos al desarrollo *in vitro* de los brotes adventicios.

De los factores importantes que se han evaluado en estas investigaciones son: el efecto que produce el regulador de crecimiento empleado, su concentración, el tiempo mínimo que requiere estar expuesto el explante utilizado para tener un estímulo adecuado y que las células dirijan su respuesta a una u otra expresión morfo genética.

En el cultivo *in vitro* de coníferas la BA es la citocinina que se ha empleado preferentemente para la formación de brotes adventicios (Cheah y Cheng, 1978; von Arnold y Eriksson, 1979; Kirby y Schalk, 1982; von Arnold y Eriksson, 1985; Flinn *et al.*, 1988; Webb y Flinn, 1991; Harry y Thorpe 1994). La concentración en la que se ha utilizado oscila entre 0.22 a 5.0 mg·l<sup>-1</sup>, como en *Pinus banksiana* (Chesick y Bergmann, 1991), *Pinus caribaea* (Berlyn *et al.*, 1991) *Pinus eldarica* (Phillips y Glädfelter, 1991), *Picea omorika* (Kolevska y Buturović, 1995), *Pinus pinea* (González *et al.*, 1998) e incluso a mayores concentraciones (10 mg·l<sup>-1</sup>) como en *Pinus elliotii* y *Pinus oocarpa* (Lesney, 1991; Schwarz *et al.*, 1991). El tiempo de exposición de los reguladores del crecimiento aplicado en los explantes (embriones, cotiledones o yemas) ha sido también evaluado, como en los ensayos de Ellis y Bilderback (1989), quienes cultivaron *in vitro* embriones de *Pinus ponderosa* en medio adicionado con 5 mg·l<sup>-1</sup> de BA en diferentes tiempos de incubación durante 1, 2, 3, 4, 7 o 14 días para posteriormente ser transferidos a medio sin reguladores del crecimiento. De este modo fue posible establecer el tiempo requerido para obtener la mayor cantidad de brotes adventicios. Para algunas especies de coníferas ha sido posible estimar el tiempo mínimo de inducción requerido como en: *Pinus ponderosa*, 7 días (Ellis y Bilderback, 1991); en hipocótilos de *Picea mariana*, 8 días (Rumary, Patel y Thorpe, 1986) y en *Pinus strobus*, de 3 a 4 días (Flinn *et al.*, 1988). Así mismo, se ha establecido que la exposición prolongada a los reguladores del crecimiento promueve o inhibe promover el decremento en la formación de los brotes,

probablemente debido a los niveles endógenos de los explantes seleccionados (von Arnold y Tillberg, 1987).

Si los cambios anatómicos asociados con la organogénesis son una manifestación del desarrollo, es necesario aclarar cuándo las células adquieren un particular rasgo citológico y bioquímico que los relacione con un nivel del desarrollo determinado (Hicks, 1980 citado por Flinn *et al.*, 1988), por lo que es evidente que se están llevando a cabo un conjunto de procesos bioquímicos y fisiológicos como: la síntesis de proteínas, la formación de polirribosomas así como cambios cualitativos en el espectro de nuevas proteínas sintetizadas (Kulaeva y Romanko, 1967; Short *et al.*, 1977; Fosket *et al.*, 1977 citados por Thorpe y Biondi, 1984) y que estos procesos se incrementarán, activarán o suprimirán dependiendo de la concentración del regulador del crecimiento utilizado, así como del tiempo en que el explante esté en contacto con él.

Para evaluar estos cambios, se han desarrollado diversas técnicas histoquímicas y bioquímicas para esclarecer y generar conocimientos sobre aspectos metabólicos y fisiológicos que ocurren en la diferenciación, estas técnicas incluyen metodologías para analizar las proteínas sintetizadas durante los procesos de diferenciación (Yasuda *et al.*, 1980), la incorporación de precursores radioactivos como  $^3\text{H}$ -leucina en las proteínas, ( $^3\text{H}$ -uridina) en el RNA y ( $^3\text{H}$ -timidina) en el DNA (Villalobos, 1983; Villalobos *et al.*, 1985, Thorpe y Kumar, 1993) o la evaluación de los cambios en la cantidad y distribución de almidón, lípidos y otros compuestos en los tejidos previos a la formación de órganos (Thorpe y Murashige, 1970; Thorpe y Meier, 1972 citados por Villalobos, 1983; Patel y Berlyn, 1982).

#### *Competencia morfológica y cambios histológicos*

Los evidentes cambios morfológicos que se presentan en los explantes como son: el aspecto nodular, la proliferación de tejido con apariencia de callo y su posterior desarrollo a brotes adventicios, promovió que el análisis del proceso de desarrollo de los brotes en los explantes cultivados, se realizara en el ámbito histológico para comprender la forma o mecanismos que intervienen en la activación celular y el patrón de crecimiento celular.

Dentro de los primeros estudios que describen los eventos secuenciales que se presentan durante el desarrollo de los brotes adventicios en Coníferas, está el realizado por Cheah y Cheng en 1978 en

cotiledones de plantas germinadas *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii*, cultivados en medio adicionado con BA y ANA, las etapas observadas las definieron y describieron como a continuación se indica:

a) **meristemoides**: masa esférica de células meristemáticas, pequeñas, isodiamétricas, con citoplasma denso y núcleos grandes aparentemente sin vacuolas. El inicio de este proceso parece ocurrir en la periferia de los explantes, la proliferación de estas células resultan del hinchamiento del explante y la formación de un tejido nodular llamado "centro meristemático" o "tejido meristemático".

b) **primordio de brote**: es un meristemoide en el cual sus células se han diferenciado en dos tipos: células de la región superior del meristemoide (cara de la epidermis) que proliferan rápidamente en una masa celular consistente de pequeñas células uniformes, mientras que las células de la región inferior del meristemoide (debajo del centro meristemático) no sólo se dividen a una tasa reducida sino que incrementan en tamaño con grandes vacuolas, que pueden acumular sustancias como taninos. La continua proliferación de las pequeñas células meristemoides da lugar a la formación de un primordio de brote arriba de la superficie del cotiledón.

c) **ápice meristemático con primordios foliares**: ya formado el primordio de brote, las células localizadas en la capa externa de la zona periférica adyacente al domo apical, inician una rápida división periclinal y da lugar a los primordios foliares, los cuales se observan como pequeñas prolongaciones en ambos lados del meristemo.

d) **brotos adventicios**: el brote continúa su elongación, el primordio foliar madura y se forman nuevas hojas que continúan emergiendo cerca del meristemo. Debajo del meristemo, el tallo se diferencia y posteriormente se desarrolla el brote completo.

Este trabajo puso de manifiesto, además de la secuencia que se presenta durante el desarrollo de los brotes adventicios, la importancia de la presencia de los reguladores de crecimiento para la formación de los brotes adventicios y concuerda con lo señalado por Villalobos *et al.* (1985) sobre la formación de áreas nodulares meristemáticas y brotes que parece estar determinada, en parte, por el tiempo que permanece el explante en contacto con el regulador de crecimiento y la participación de las citocinas con un papel importante durante este proceso. Este mismo autor en 1983 describió en cotiledones de *Pinus radiata* la presencia de agrupaciones de 3 a 6 células que denominó promeristemoide, estas son células que están en el inicio del proceso de la determinación que anteceden a la formación de los

meristemoides y se presentan durante etapas muy tempranas de formación de los brotes adventicios en cotiledones de *Pinus radiata*. Estudios posteriores realizados por Flinn *et al.* (1988) sugieren que los promeristemoides son entidades determinadas y su presencia paralelamente incrementa los niveles de determinación de los brotes.

Si conjuntamos las observaciones realizadas por Cheah y Cheng (1978) y Villalobos (1983), podemos establecer que los eventos que se suscitan durante la formación de los brotes adventicios son: promeristemoides, meristemoides, primordios de brote, ápices meristemáticos con primordios foliares y brotes adventicios.

Para observar la correlación entre órgano y tejido en la morfogénesis, Tran Thanh Van y colaboradores (1976) desarrollaron un modelo consistente en una delgada capa de células compuesta de unos a seis estratos de células citológicamente diferenciadas: la epidermis y las células subepidérmicas. Usando este modelo, se han estudiado diversos eventos morfogénéticos aplicando técnicas histoautoradiográficas, histológicas y ultraestructurales (Tran Thanh Van y Dien, 1976, citados por Villalobos, 1983). Estos estudios han demostrado que todos los órganos provienen de la misma capa de células, la capa subepidérmica, y son visibles después de 8 a 10 días de cultivo, además se muestran importantes cambios como el incremento en la densidad ribosomal entre otros (Villalobos, 1983).

Los distintos trabajos realizados sobre la competencia morfogénética, apoyados con estudios histológicos, aportan información sobre los eventos que se presentan en el explante durante la formación de los brotes adventicios, en el tiempo de exposición, concentración y tipo de regulador del crecimiento utilizado, lo que permite establecer parámetros que permitan obtener un mayor número de regenerantes.

#### *Competencia morfogénética y síntesis de proteínas*

Aunque las funciones primarias de las citocininas y auxinas no son aún claras, hay suficientes evidencias que sugieren que la respuesta hormonal es mediada a través de la síntesis de RNA y proteínas (Key y Vanderhoef, 1973; Skoog, 1973; Jacobsen, 1977, citados por Yasuda *et al.*, 1980). De los reguladores del crecimiento empleados, las citocininas promueven la formación de brotes adventicios, participan en la activación y estimulación de la síntesis de RNA, de proteínas y en la actividad enzimática (von Arnold y Eriksson, 1985; Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993).

En experimentos realizados en embriones de *Pinus coulteri* se demostró que entre los primeros eventos que conducen a la formación de múltiples yemas adventicias está el incremento de los niveles de RNA, DNA, proteínas nucleares básicas y la acumulación de reservas tales como lípidos, proteínas y almidón (Patel y Berlyn 1983), lo que indica una intensa actividad metabólica en etapas tempranas de iniciación de los cultivos.

La mayoría de las investigaciones se han enfocado a esclarecer qué proteínas están presentes en embriones cigóticos de distintas gimnospermas (Allona *et al.*, 1994), determinar las proteínas que intervienen en la formación de embriones somáticos como en *Picea glauca* (Flinn *et al.*, 1991), así como el desarrollo de diversas técnicas para estimar y cuantificar las proteínas presentes en acículas o meristemos de coníferas (Bonn, 1989; Davidsen, 1995); toda esta información nos permite tener puntos de referencia para comparar y evaluar los eventos morfogénéticos que se presentan en condiciones *in vitro*; y pocos son los trabajos, como el desarrollado por Yasuda *et al.* (1980), que abordan la participación de las proteínas durante la formación de brotes adventicios a partir de cotiledones cultivados *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii*, donde observaron que en el citoplasma de los mismos se sintetizaban proteínas durante las etapas tempranas de la formación de los regenerantes. Hasegawa *et al.* (1979) citados por Yasuda *et al.* (1980) indican que por medio de técnicas como el marcado de proteínas y la electroforesis en geles de SDS-poliacridamina ha sido posible observar que en cultivos donde se generan brotes adventicios, éstos poseen una gran cantidad de proteínas de bajo peso molecular (16,000 a 20,000 daltons).

Aún así, se requiere realizar extensas investigaciones que nos permitan determinar con claridad, el papel que juegan los reguladores del crecimiento en la activación o inhibición de los procesos bioquímicos que intervienen en la adquisición de las células para ser capaces de responder y manifestarse en respuestas morfogénéticas.

### *Competencia morfogénica y pruebas autoradiográficas*

La incorporación de precursores radioactivos es otra técnica que ha permitido comprender algunos de los eventos que se presentan durante los procesos de diferenciación. Villalobos (1985) incorporó precursores en cotiledones de *Pinus radiata* cultivados en presencia o ausencia de BA en diferentes tiempos de incubación y logró establecer diferencias entre los explantes cultivados. Observó que la incorporación de la  $^3\text{H}$ -uridina en el RNA en las células epidérmicas y subepidérmicas de los cotiledones expuestos al regulador de crecimiento se presentó al tercer día de cultivo, evento que no se manifestó en los explantes cultivados en ausencia de BA; así mismo observó que el patrón de incorporación de la  $^3\text{H}$ -leucina en las proteínas fue similar al de la  $^3\text{H}$ -uridina durante los días 1 y 2 de cultivo con una deposición azarosa de granos de plata. Este tipo de técnicas han permitido esclarecer algunos de los procesos tempranos que se llevan a cabo en los primeros días de cultivo.

### *Competencia morfogénica y cambios en la cantidad y distribución de almidón, lípidos y otros compuestos*

Los procesos morfogénicos requieren de una alta demanda de energía y el almidón es una fuente fácilmente disponible, su presencia en estos eventos ha sido estudiada entre otros por: Brossard (1975) citado por Patel y Berlyn (1983) y Murashige y colaboradores citados por George (1993). Los autores señalan que en segmentos de tallo y callo de *Nicotiana tabacum* se manifestó el incremento y acumulación de almidón justamente previo a la formación de meristemoides, sitio donde los brotes se formarán, por lo que se ha sugerido que la presencia de almidón puede ser un requisito previo a la morfogénesis. Así mismo ha sido posible observar que durante la formación de brotes en callo de *Nicotiana tabacum* aquellos tejidos que forman órganos tienen una alta tasa de respiración en comparación con los tejidos que no los forman, lo que indica una intensa actividad metabólica (Thorpe y Meier, 1972; Ross y Thorpe, 1973 citados por Villalobos, 1983).

El aspecto y el contenido inicial de sustancias de reserva de un embrión maduro, ha sido analizado por Krasowski y Owens (1993), los cuales describieron el desarrollo del embrión cigótico de *Picea glauca* y mostraron que durante su maduración el almidón se acumuló principalmente dentro de la cofia y fue menos abundante en el resto del embrión, así mismo se observaron proteínas y cuerpos con lípidos de manera consistente en el embrión maduro. Bewley y Black (1989) y Flinn *et al.* (1989), citados por Flinn *et al.* (1991), señalan que un embrión cigótico maduro de conífera contiene una importante reserva de proteínas



almacenadas, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores para comparar la maduración del embrión cigótico y el embrión somático.

En diversos estudios realizados bajo condiciones controladas, ha sido posible establecer la distribución de almidón y lípidos y su posterior uso durante los eventos morfogénéticos. En embriones de *Pinus coulteri* la acumulación de almidón se observó como un evento temprano de la organogénesis que posteriormente disminuyó al formarse los brotes, los autores señalan que durante los eventos morfogénéticos, los granos de almidón posiblemente son movilizados y metabolizados como una fuente primaria, de energía para la diferenciación y crecimiento de los primordios de brote (Patel y Berlyn, 1983).

Thorpe y Kumar (1993) citan los trabajos realizados en cotiledones de *Pinus radiata* por Douglas *et al.* (1982) y Patel y Thorpe, (1984) en donde muestran que los granos de almidón, que son abundantes al inicio del cultivo, al tercer día de incubación son utilizados lentamente cuando se forman los centros organogénicos. Se ha reportado también, que durante las etapas tempranas de la formación de los brotes adventicios a los lados del meristemo, hay una zona en que se desarrollarán los primordios foliares y requieren de una gran cantidad de energía metabólica que será proporcionada por las proteínas presentes. Al iniciarse la formación de los primordios foliares se lleva a cabo una serie de divisiones y la formación de nuevas células requiere de un rápido rompimiento de lípidos o que haya una disponibilidad de ellos debido a la formación de las membranas celulares (Thorpe y Biondi, 1984).

Durante el desarrollo del brote, la acumulación de cuerpos proteicos se localiza en las hojas ya desarrolladas así como en los primordios foliares, de esta manera es posible tener almacenada una fuente de nitrógeno, carbón y la energía capaz para ser movilizada rápidamente y participar en los procesos que requieren de altos niveles energéticos, como es la formación de los brotes (Biondi, 1980, citado por Thorpe y Biondi, 1984).

Lo anteriormente señalado nos indica que el conocimiento de los eventos histológicos, histoquímicos y bioquímicos previos y durante la formación y desarrollo de los brotes adventicios, permitirá establecer en qué momento las células del explante seleccionado se encuentran en una etapa o estado de competencia, que sea capaz de responder morfogénicamente al ser expuestos al medio de cultivo favorable, con una adecuada proporción de citocinina durante el tiempo de inducción necesario para tener éxito en la micropropagación y obtener un número representativo de brotes adventicios por explante, en

especies de importancia ecológica o económica. En el caso de *Picea chihuahuana* se propusieron los siguientes objetivos para evaluar los siguientes aspectos:

#### Objetivo general

Describir, por medio de técnicas histológicas y bioquímicas las diferentes etapas que se manifiesten en los distintos tiempos de inducción ensayados en embriones de *Picea chihuahuana*.

#### Objetivos particulares

1) Establecer, con base en los tiempos mínimos estimados para la adquisición de la competencia morfogénica, los eventos histoquímicos que se presenten durante la formación de las estructuras regeneradas *in vitro* (brotes o embriones somáticos) a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*.

2) Evaluar las proteínas totales presentes en las concentraciones y tiempos de inducción en los que se observó la mayor competencia morfogénica para determinar su correlación con la formación de los brotes adventicios.

## *Materiales y Métodos*

### *Histología*

Con base en los resultados obtenidos en la organogénesis y en la competencia morfológica, se seleccionaron aquellos cultivos que generaron un mayor número de brotes adventicios para realizar el análisis estructural. Posterior al tratamiento de desinfección descrito en el Capítulo II, dos embriones de los doce sembrados inicialmente en las concentraciones 3 y 5 mg l<sup>-1</sup> tanto de BA como de K, se colectaron en diferentes tiempos de exposición 0, 3, 7, 14, 17, 24 y 30 días.

Inmediatamente fueron fijados en FAA (formaldehído: ácido acético: etanol: agua, 10:5:50:35) adicionado con sacarosa (0.12 M), permanecieron mínimo 48 hr. Posteriormente los explantes se lavaron en agua corriente durante 2 horas y se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales: 30, 50, 70, 80, 96 y 100% (v/v), durante 15 min cada uno, en seguida se colocaron las muestras 5 min en xilol y fueron preincluidos en diferentes mezclas de xilol:paraplast (1:1), (1:2) y paraplast puro durante 24 horas cada una. Finalmente las muestras fueron incluidas en paraplast puro.

Para lograr la correcta orientación de los embriones para su corte, fue necesario conservar el paraplast líquido, para tal efecto se colocaron cajas de papel (1 x 1 x 1 cm), elaboradas previamente, sobre una charola de aluminio y ésta a su vez en un recipiente de vidrio con agua caliente (40°C); el calor del agua permitió que el paraplast que se vació en las cajas de papel, se conservara líquido. Con auxilio de agujas de disección se tomó el embrión, se le dio la orientación requerida y fue etiquetado.

Se realizaron cortes secuenciales de los embriones en un microtomo de rotación con 4 y 5 µm de espesor. Los cortes se tiñeron con tinciones dobles de safranina-verde rápido (S-VR) para observar núcleos y divisiones mitóticas (Johansen, 1940) y con ácido peryódico- Reactivo de Schiff – azul negro naftol para polisacáridos insolubles y proteínas (Jensen, 1962). Las mejores preparaciones se montaron en bálsamo de Canadá y se cubrieron con un cubreobjetos. Se realizó la toma de fotografías en un fotomicroscopio.

### *Extracción de proteínas*

Se determinó el peso molecular de las proteínas totales a partir de embriones cultivados en 5 mg l<sup>-1</sup> de BA y K procedentes de los tiempos de inducción 0, 14, 24 y 30 días. Para cada tratamiento

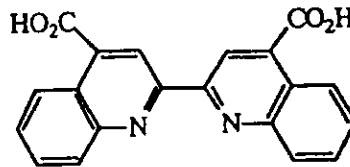
se sembraron aproximadamente entre 60 y 70 embriones. Posteriormente del tiempo de inducción establecido, los embriones se colectaron y se maceraron con hielo seco adicionado con una solución reguladora de fosfatos (0.05 M más 0.1 M de NaCl, pH 6.5), posteriormente la mezcla se homogeneizó la mezcla y se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min, se tomó el sobrenadante que se dializó con una membrana Spectrapor con retención molecular de 3,500 daltones, en agua destilada fría. Se realizaron cambios de agua destilada cada 2 horas, y finalmente se dejó durante una noche en agua destilada y en refrigeración, después del último cambio se procedió a liofilizar la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo con cada uno de los tiempos de inducción ensayados y concentración del regulador del crecimiento, se obtuvo un total de 7 muestras incluyendo al grupo control.

*Cuantificación de proteínas en espectros de absorción a 280 y 562 nm*

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas a 280 nm de absorción, debido a que en esta región es posible detectarlas por medio de este método su absorbancia y coeficiente de extinción. La absorbancia de cada proteína depende del número y posición de sus residuos de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano, así como de los puentes disulfuro existentes entre las cisteínas (Greigton, 1993).

Esto se llevó a cabo por un método espectrofotométrico muy sensible para la determinación de proteína, el ácido Bicinonínico (BCA) (Fig.1) Protein Assay Reagent (Smith *et al.*, 1985), que en su forma de sal de sodio soluble en agua es sensible, estable y altamente específico hacia el ión cuproso ( $\text{Cu}^+$ ).

Fig. 1  
\*Ácido bicinonínico (BCA)



Este método combina la reacción de Biuret en la cual los enlaces peptídicos de la proteína reaccionan con el  $\text{Cu}^{2+}$  en un medio alcalino para producir  $\text{Cu}^{+}$ , que en presencia del BCA, da como resultado una reacción color púrpura que involucra a dos moléculas de BCA con una del ión cuproso  $\text{Cu}^{+}$ . (Fig. 2).

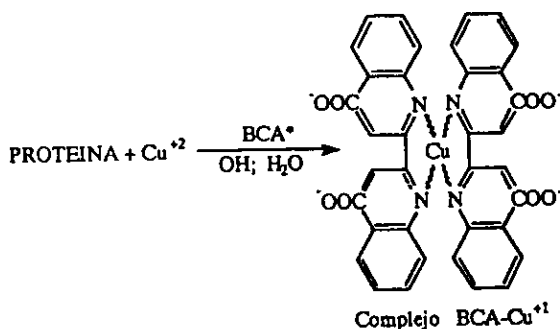


Fig. 2 Formación de dos moléculas de BCA con una del ión cuproso.

Este complejo es soluble en agua y tiene un máximo de absorción a 562 nm (Greighton, 1993).

El reactivo comercial de Pierce consta de:

**Reactivo A:** carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconfónico y tartarato de sodio en solución acuosa de  $\text{NaOH}$  0.1 M

**Reactivo B:** Solución acuosa de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 4%.

La solución de trabajo se preparó en una proporción de 50 partes del reactivo A y 1 parte del reactivo B, se tomó 0.1 ml de las muestras y se colocaron en tubos de ensaye, a cada uno se le agregó 2 ml de la solución de trabajo y se mezcló, posteriormente se incubaron en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 280 y 562 nm contra la referencia de agua destilada.

La cantidad de proteínas contenida en la muestra se determinó interpolando el dato obtenido en la curva de calibración.

El peso molecular de las proteínas totales se determinó por electroforesis en microgeles de SDS-poliacrilamida (sodio dodecil sulfato) (0.45 x 43 x 50 mm) con gradiente diferencial 8-25% a 250 V, 10 mA y 15°C. Se utilizaron patrones de peso molecular conocidos desde 14 400 hasta 94 000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit), los patrones utilizados fueron: Fosforilasa b (94 000), Albúmina de bovino (67 000), ovoalbúmina (43 000), Anhidrasa carbónica (30 000), Inhibidor de tripsina de frijol de soya (20 100) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14 400).

Se utilizó el procedimiento para fijar, teñir y desteñir descrito por Neuhoff *et al.*, (1985), con azul brillante Coomassie y con el método de nitrato de plata, (PhastGel Silver Kit). Todos los geles se corrieron en un equipo PhastSystem.

La posición de las bandas se realizó manualmente, se construyó una curva de calibración, en donde se trazó el logaritmo del peso molecular (Log. PM) contra el logaritmo de la movilidad relativa (Log. Rf).

## Resultados y Discusión

### Histología e histoquímica

Se observaron escasas diferencias entre los resultados obtenidos con los dos reguladores del crecimiento, por lo que las descripciones se hicieron tomando como referencia, los diferentes tiempos de exposición de los explantes.

Los cotiledones presentaron mayor capacidad morfogénica y en el hipocótilo la respuesta fue de escasa a nula. Los embriones de *P. chihuahuana* tienen la estructura típica de un embrión de conífera con un eje radícula-hipocótilo, el meristemo apical del tallo, los cotiledones, el meristemo apical de la raíz y la cofia (Fig. 3)

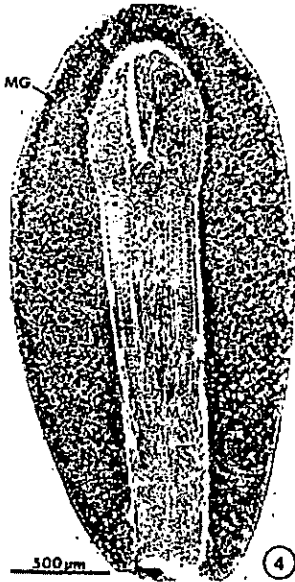


Fig. 3. Corte longitudinal de semilla madura de *Picea glauca*. Tomado de Krasowski y Owens, 1993.

Todas las estructuras están delimitadas por una protodermis que rodea al tejido fundamental y al tejido provascular como lo indica Krasowski y Owens (1993). Las células del embrión en esta etapa inicial (control) son característicamente cúbicas sin espacios intercelulares, con grandes núcleos, citoplasma denso, granular con vacuolas pequeñas y no se observaron figuras mitóticas. En los cortes teñidos con la tinción de PAS se hicieron evidentes gránulos de almidón concentrados en los cotiledones y en la parte superior del hipocótilo, con azul negro naftol se observaron, las proteínas teñidas de azul, en el citoplasma distribuidos en todo el embrión.

A continuación se presentan los resultados de las observaciones realizadas en diferentes tiempos de inducción:

Tres días en medio de inducción tanto con BA como con K, los embriones presentaron su estructura semejante a la del control y solamente se observaron algunas células en división en el ápice de los cotiledones, por lo que éstos incrementaron ligeramente su volumen pero no se detectaron estructuras organizadas. Así mismo se observaron gránulos de almidón distribuidos en la parte superior del hipocótilo y en algunas regiones de los cotiledones.

Las primeras manifestaciones de la capacidad morfogénica de los embriones se expresaron a los siete días de exposición, los cotiledones aumentaron su volumen y la división celular se generalizó. Fue posible observar patrones de división en la subepidermis de los cotiledones en los cuales, por medio de divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas incrementaron su volumen, provocando su elongación y curvatura, principalmente de aquellos que no estuvieron en contacto con el medio de cultivo. Villalobos *et al.*, 1985 observaron cambios citológicos en cotiledones de embriones germinados de *Pinus radiata* cultivados a diferentes tiempos de inducción con BA 25  $\mu\text{M}$  (5.5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), divisiones azarosas en los cotiledones durante las primeras horas de inducción y hasta tres días, la actividad mitótica se concentró en la epidermis y parénquima subepidérmica, así mismo se evidenciaron estructuras organizadas a los cinco días de cultivo cuyo origen proviene de una célula subepidérmica, que posteriormente de una serie de divisiones, dio lugar a una estructura de cuatro células, la que incrementó su tamaño como resultado de una mayor actividad mitótica para finalmente conformar los **promeristemoides**.

Así mismo Flinn *et al.* (1988) señalaron que en cotiledones de *P. strobus* al cuarto día de cultivo en medio adicionado con 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA, observaron agrupaciones compuestas de tres o cuatro células dentro de las primeras capas subepidérmicas que se formaron por divisiones periclinales seguidas de divisiones anticlinales u oblicuas; las células que conformaron esta agrupación estaban compactadas, sin espacios intercelulares, las paredes entre las células eran delgadas y la que las rodea era gruesa. Al parecer estos arreglos celulares anteceden a los promeristemoides que reportó Villalobos en *P. radiata*.

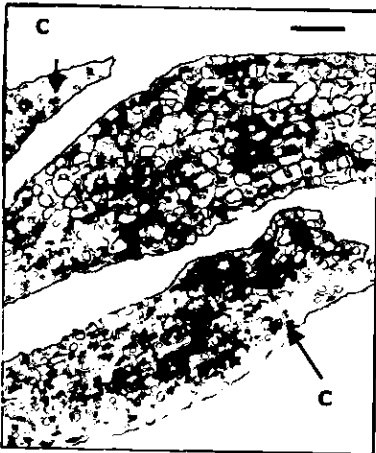


Fig. 3. Corte longitudinal de cotiledones de *Picea chihuahuana* cultivados *in vitro* con reguladores de crecimiento durante 14 días.

Escala = 150  $\mu\text{m}$ .

Con 14 días de exposición, el volumen del embrión de *P. chihuahuana* se incrementó y se manifestó en el crecimiento diferencial de los cotiledones. Los que permanecieron sin modificaciones acumularon gránulos de almidón y en los que se activó la división se observaron células de diferentes tamaños y formas con numerosas vacuolas y núcleos grandes (Fig. 3).

Las paredes de las células cotiledonarias se tiñeron intensamente con la reacción de PAS, la epidermis y las siguientes cuatro capas celulares presentaron núcleos



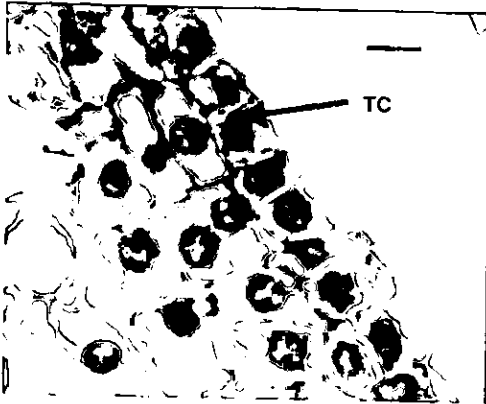


Fig. 5. Células epidérmicas y subepidérmicas de cotiledones de *P. chihuahuana* después de 14 días de inducción. Divisiones periclinales conforman hileras de 3 células. Escala = 80  $\mu\text{m}$ .

grandes y fueron positivos a la reacción para proteínas así mismo se observaron divisiones anticlinales en la epidermis (Fig. 5) y con mayor frecuencia divisiones anticlinales y oblicuas en la subepidermis que conformaron agrupaciones de tres o cuatro células (Fig. 6), que fueron más evidentes en los tratamientos con  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de K, en la región media del hipocótilo se observó la acumulación de proteínas. La presencia de divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas es un patrón morfológico que se observó también en

cotiledones de *Pinus strobus*, *P. ponderosa* y *P. radiata* a tres días de iniciado el cultivo (Flinn *et al.*, 1988; Webb y Flinn, 1991; Villalobos *et al.*, 1985), lo que indica que la respuesta morfogénica se manifiesta en tiempos más cortos en estas especies en comparación con *P. chihuahuana*, que requiere más tiempo de exposición en los reguladores del crecimiento, esto probablemente se deba a la menor sensibilidad de los tejidos a los agentes externos. Ellis y Bilderback (1989) mencionan que en hojas cultivadas de *Convolvulus* se identificaron periodos críticos durante la organogénesis *in vitro* que se manifestaron en tiempos específicos de exposición a los reguladores del crecimiento, esto indica que la precisa secuencia de estímulos controlados *in vitro* y la sensibilidad de los tejidos pueden lograr un estado de competencia y dar lugar a las respuestas morfogénicas.



Fig. 6. Divisiones anticlinales y oblicuas dieron lugar a agrupaciones de tres células en los cotiledones, después de 14 días de inducción. Escala = 70  $\mu\text{m}$ .

En *P. chihuahuana* el tejido del hipocótilo incrementó su volumen así como su aspecto laxo, se observaron células que no conservaron su integridad, con desorganización epidérmica, núcleos dispersos y paredes celulares rotas (Fig. 7), este aspecto nos indica que el tejido probablemente en etapas iniciales de incubación presentó una alta frecuencia de divisiones que incrementó su biomasa, generando células grandes, muy vacuoladas y paredes celulares delgadas, que al momento de ser cortadas en el microtomo se desgarraron (rompieron).



Fig. 7. Corte longitudinal de cotiledón de *Picea chihuahuana*, se observa un bloque de 3 a 4 capas celulares que conservan su integridad y tejido laxo en el mesófilo.  
Escala = 50  $\mu$ m.

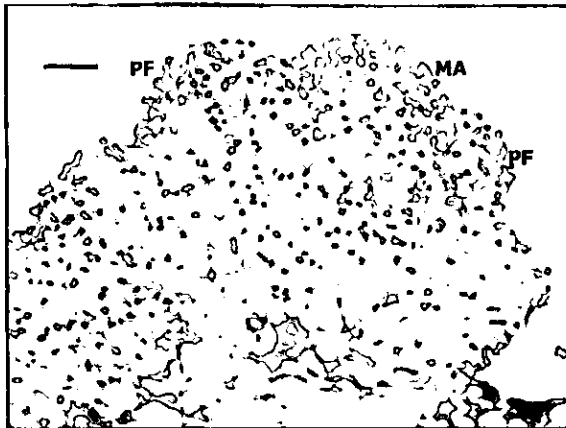


Fig. 8. Corte longitudinal de un explante después de 24 días de cultivo en medio de inducción. Se observa una etapa temprana de un brote adventicio con el meristemo apical y a los lados un par de primordios foliares.  
Escala = 100  $\mu$ m

A los 24 días el tejido de los cotiledones conservó solo su integridad en parte, la zona del mesófilo se observó laxa así como también algunas capas celulares de la subepidermis. En esta etapa fue evidente la presencia de brotes con meristemas y primordios foliares en diferentes etapas de desarrollo que tuvieron su origen en la subepidermis.

En presencia de BA se observaron éstos en fases iniciales (meristemo apical y primordios foliares) siendo más evidentes cuando se usó la concentración de 3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Fig. 8).

Los meristemas más desarrollados (meristemo apical con varios primordios foliares) se presentaron en el tratamiento de K ( $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Fig. 9). Algunas zonas de la epidermis así como los meristemas presentaron reacción positiva a proteínas, mostrando ser zonas con una alta actividad mitótica e intensa síntesis proteica, los gránulos de almidón estuvieron presentes en la parte central del hipocótilo y en los primordios foliares ya desarrollados. En esta fase aparecen células que contenían taninos, lo que indica etapas más avanzada de diferenciación.

Con 30 días de exposición el hipocótilo no conservó su integridad celular y los cotiledones mostraron tres zonas: la más interna presentó un arreglo celular laxo con grandes espacios intercelulares (I); la más



Fig. 9. Corte longitudinal de un embrión de *P. chihuahuana* con un meristemo apical y primordios foliares desarrollándose en el ápice de un cotiledón. Escala =  $300 \mu\text{m}$ .



Fig. 10. Corte longitudinal de un cotiledón después de 30 días de cultivo en medio de inducción. Se puede observar tres estratos. Escala =  $150 \mu\text{m}$ .

externa (E) se constituyó por aproximadamente cinco estratos de células pequeñas con núcleos muy grandes y sin espacios intercelulares. Entre las dos se localizó una capa formada por varios estratos con células alargadas con núcleos pequeños y paredes celulares delgadas (M) (Fig. 10).

Los cotiledones que conservaron menor integridad fueron los que estuvieron expuestos a los tratamientos con K, en los tratamientos con BA fue posible apreciar agrupaciones de 3 a 4 células similares a las que se manifestaron con  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de K, pero a los 14 días.

La desintegración celular que presentan los explantes es atribuida al agotamiento de citocininas endógenas (Cheah y Cheng, 1978) y está fuertemente influenciada también por el medio de cultivo utilizado, recientemente Olguín-Santos (comunicación personal) encontró que la desorganización de los tejidos internos del embrión de *P. chihuahuana* se presentó en el medio B5 modificado y no en otros medios ensayados como el SH o MS, los cuales contienen menores cantidades de compuestos nitrogenados.

El efecto de las concentraciones del medio de cultivo ha sido estudiado entre otros por von Arnold y Eriksson (1981), quienes determinaron que el mayor porcentaje de brotes adventicios formados a partir de embriones de *Pinus contorta* estaba en función de la dilución de los componentes del medio de cultivo, observaron que la mejor dilución fue a una cuarta parte de sus componentes que cuando emplearon el medio en su concentración normal o al doble de ésta, donde el porcentaje de brotes disminuyó de un 60% a un 2%.

En esta misma etapa se presentaron células con taninos en su interior alrededor de los haces vasculares, epidermis, primordios foliares de los brotes desarrollados y con mayor abundancia en el hipocótilo de los cultivos de *P. chihuahuana*. La presencia de taninos ha sido reportada por Cheah y Cheng (1978), en cotiledones, callos y células en suspensión de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco; este evento parece ser un fenómeno común entre las coníferas que ha sido ya reportado en diversos trabajos (Ball, 1950; Constabel, 1963; Jorgeson y Balsillie, 1969; Chafe y Durzan, 1973; Baur y Walkinshaw, 1974; Parameswaran y Bauch, 1975, todos citados por Cheah y Cheng 1978).

Las tinciones realizadas con S-VR y PAS evidenciaron que la epidermis y primeras capas subepidérmicas de los cotiledones de *P. chihuahuana* fueron las que presentaron mayor actividad mitótica que el resto del embrión, con divisiones anticlinales y periclinales que dieron lugar a las agrupaciones de 3 y 4 células, las que se caracterizaron por tener núcleos grandes, citoplasma denso, sin espacios intercelulares y fueron positivas a la reacción para proteínas. Los ápices meristemáticos en desarrollo presentaron células isodiamétricas en la epidermis y subepidermis con núcleos grandes que fueron positivos para el negro naftol; en ambos lados del ápice se observaron zonas densas con células de menor tamaño y paredes delgadas que preceden a la formación de los primordios foliares y fueron positivos para PAS y negro naftol lo que indica la presencia de proteínas en regiones de gran actividad celular y que está influenciada en gran medida por la presencia de los reguladores del crecimiento.

von Arnold y Eriksson (1985); Bonga y von Aderkas (1992) y George (1993) hacen referencia de la acción de las citocininas como promotoras de la formación de brotes adventicios donde la síntesis de proteínas y la actividad enzimática son evidentes; así mismo se ha demostrado que en *Pinus coulteri*, antes de la formación de los brotes múltiples, hay un incremento en los niveles de RNA, DNA y proteínas nucleares básicas así como la acumulación de lípidos, proteínas y almidón (Patel y Berlyn, 1983).

En los embriones de *P. chihuahuana*, los sitios donde se desarrollaron los brotes adventicios se reconocieron también por la presencia de gránulos de almidón y proteínas. Inicialmente se concentraron en los cotiledones y en la parte superior del hipocótilo y al incrementarse el tiempo de inducción se observaron principalmente en la epidermis y las cuatro capas celulares subyacentes de los cotiledones donde posteriormente se desarrollaron los brotes adventicios. Los gránulos de almidón estuvieron presentes en menor proporción en la parte central del hipocótilo y en los primordios foliares ya desarrollados.

Se tiene conocimiento de que en los procesos morfogénéticos se requiere de una alta demanda de energía y la presencia del almidón ha sido estudiada en *Nicotiana* por Brossard (1975) citado por Patel y Berlyn (1983) y Murashige y colaboradores citados por George (1993), ellos observaron el incremento de almidón en el sitio donde se formaron los brotes; así mismo en embriones de *Pinus coulteri* la acumulación de almidón se presentó como un evento temprano de la organogénesis (Patel y Berlyn, 1983); en cotiledones de *Pinus radiata* se mostró que los granos de almidón, que son abundantes al inicio del cultivo, fueron utilizados lentamente al tercer día de incubación cuando se inició la formación de los centros organogénicos Patel y Thorpe, (1984) citado por Thorpe y Kumar (1993).

Todo ello ha sugerido que la presencia de gránulos de almidón, puede ser un requisito previo a la morfogénesis y que éstos van disminuyendo al ser movilizados y metabolizados como una fuente primaria de energía para la diferenciación y crecimiento de los brotes adventicios (Patel y Berlyn, 1983).

También fue posible observar en los embriones de *P. chihuahuana* a partir de los 24 días de inducción, células conteniendo taninos distribuidos en la parte central del hipocótilo, alrededor del tejido vascular y epidermis, en algunos casos se observaron también en las hojas de los brotes adventicios en etapas avanzadas de desarrollo. La presencia de los taninos indica un estado avanzado de diferenciación y ha sido reportada en cotiledones, callos y cultivos de células en suspensión de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco y parece ser común en otros cultivos de coníferas *in vitro* (Cheah y Cheng, 1978; Harry

y Thorpe, 1994). Para llevar a cabo esta fase experimental se registró el peso fresco de los embriones cultivados y se estimó el porcentaje de aquellos que respondieron antes de ser procesados para la realizar las pruebas bioquímicas.

#### *Determinación del peso molecular*

Después de procesar los geles de SDS para determinar las proteínas totales, se realizó el estudio para caracterizar cada una de estas bandas, desafortunadamente las bandas no se manifestaron con total claridad y se separaron escasamente entre si probablemente porqué las proteínas se precipitaron cuando se realizó la diálisis de la muestra, aunque se redisolvieron con NaCl, pero con poco éxito. Solamente se manifestaron algunas bandas del grupo control y de uno de los tratamientos ( 14 días de inducción en 5 mg l<sup>-1</sup> de K), manualmente se determinó su posición y se estimó el peso molecular (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos del número de bandas y peso molecular estimados (daltons) que se evidenciaron en embriones de *P. chihuahuana* utilizados como grupo control y en un ensayo realizado con 14 días de inducción en medio B5 modificado adicionado con 5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina.

	Peso Molecular estimado (daltons)	
	Control	14 días / K
	11,4100	138,390
	67,700	110,130
	30,100	25,346
	18,900	17,852
	13,300	

#### *Cuantificación de proteínas*

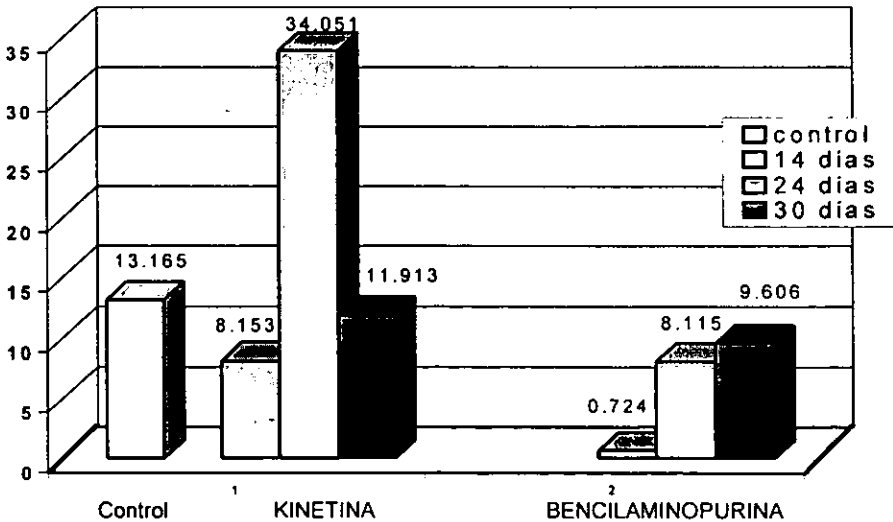
Las lecturas de absorbancia obtenidas para determinar espectrofotométricamente las proteínas nos proporcionaron la cantidad de proteínas totales presentes en los diferentes tiempos de inducción (Tabla 3), que pudieran intervenir en las diferentes fases del desarrollo de los brotes adventicios y permitieron inferir la actividad metabólica presente.

Tabla 3. Resultados de la absorbancia y cuantificación de proteínas totales en embriones de *P. chihuahuana* sometidos a diferentes tiempos de inducción en medio B5 modificado adicionado con 5 mg l<sup>-1</sup> de Kinetina o de BA.

Tratamientos	Absorbancia (280 nm)	Absorbancia (562 nm)	Proteína total (mg/μl)
Control	.480	1.916	13.165
14 días / BA	1.02	0.147	.724
24 días / BA	.744	1.198	8.115
30 días / BA	.753	1.41	9.606
14 días / K	1.59	1.20	8.153
24 días / K	2.1	4.886	34.051
30 días / K	.620	1.738	11.913

En la gráfica 1 se observa que el grupo control presentó una concentración de proteínas de 13.165 mg 100 μl<sup>-1</sup>, en los tratamientos con BA, la cantidad de proteínas es menor a los 14 días (0.724 mg 100 μl<sup>-1</sup>) y se incrementó ligeramente (8.11 mg 100 μl<sup>-1</sup>) al transcurrir el tiempo de inducción, pero no alcanzó el nivel del grupo control (9.606 mg 100 μl<sup>-1</sup>), lo cual podría deberse a que con BA los embriones de *P. chihuahuana* requieren de mayores tiempos de inducción para sintetizar suficientes proteínas que puedan manifestarse en los cambios histológicos que lleven a la formación de brotes adventicios en tiempos cortos.

Gráfica 1.-Cuantificación de proteínas totales (mg 100 μl<sup>-1</sup>) en embriones de *P. chihuahuana* a diferentes tiempos de inducción en presencia de 5 mg l<sup>-1</sup> de Kinetina y BA.



En los tiempos de inducción ensayados se observó que en la kinetina se presentó una mayor cantidad de proteínas totales desde el día 14 de inducción ( $8.156 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ), relativamente cercano al control ( $13.165 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ), que se incrementó notablemente a los 24 días de inducción ( $34.051 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ), y posteriormente decreció a ( $11.913 \text{ mg } 100 \mu\text{l}^{-1}$ ), cantidad cercana al grupo control. Esto puede mostrar el efecto del estímulo que produce la kinetina en la síntesis de proteínas y la gran actividad metabólica que está ejerciendo en los embriones de *P. chihuahuana*.

Estos resultados son similares a los reportados por Yasuda *et al.* (1980), los autores ensayaron con cotiledones de *Pseudotsuga menziesii* colocados en medio adicionado con 5 nM de ANA y 5  $\mu\text{M}$  de BA los cuales fueron retirados a los 2, 4 y 8 días de iniciado el cultivo, procesaron las muestras y observaron un marcado incremento de nuevas proteínas sintetizadas de bajo peso molecular, el incremento fue notorio después del segundo día de cultivo, alcanzando su nivel máximo al cuarto día y al octavo día regresó al nivel del segundo día. El incremento de las proteínas señalan los autores, es debido a la estimulación de los reguladores del crecimiento presentes en el medio de inducción y ha sido posible asociarlo al cultivo de brotes y morfológicamente ser comparado con distintos tipos de cultivos (Hasegawa *et al.*, 1979 citados por Yasuda *et al.*, 1980).

El estímulo adecuado proporcionado por el regulador de crecimiento promoverá la mayor o menor formación de brotes adventicios y es factible esperar que la cantidad y diversidad de proteínas serán diferentes en las distintas etapas analizadas del desarrollo de los brotes si se considera que la diferenciación de los tejidos y en forma primaria, de las células, traducen temporalmente ciertas partes del total de su información genética (genoma) (George, 1993).

Probablemente sea necesario realizar ensayos aplicando mayores tiempos de inducción pero empleando un medio de cultivo con menos componentes ya que el efecto del medio de cultivo sobre los embriones es altamente significativo (Olguín-Santos, com. pers), por qué el tejido tiende a desorganizarse y solo se conservan escasamente de 1 a 2 capas celulares de los cotiledones que no permite que se desarrollen los brotes adventicios.

Lo anteriormente señalado demuestra que la capacidad de respuesta morfogénica de los embriones de *P. chihuahuana* con relación a otras especies de Pinos y los prolongados tiempos de exposición a los reguladores del crecimiento que se requiere para dar lugar a la formación de brotes adventicios, se puede atribuir en gran medida, a la pérdida de su agresividad regenerativa. Gordon



(1968) y Ledig *et al.*(1997) señalan que ésta pérdida puede deberse a la depauperización del biotipo, su restricción en un hábitat altamente especializado que da como consecuencia un limitado pool genético, así como al alto nivel de entrecruzamiento que disminuye su capacidad reproductiva.

La estrategia que proponen Ledig *et al.* (1997) para conservar esta especie es restituyendo el flujo genético entre las poblaciones, transplantando plántulas entre ellas en un área geográfica determinada, que si prosperan podrían fomentar el entrecruzamiento.

La vía alternativa además de los estudios isoenzimáticos, que ayudarían a evaluar a las poblaciones para este fin, es estimando la capacidad morfogénica *in vitro* de las mismas que redundará en la exitosa micropropagación de esta especie para generar individuos e introducirlos en las poblaciones.

### *Conclusiones*

Los estudios histológicos han revelado que el origen de los brotes adventicios es por organogénesis y vía directa a partir de las células de la epidermis y capas celulares superficiales subyacentes.

Se demostró que la kinetina promueve los mismos patrones celulares y el desarrollo de brotes en tiempos de incubación más cortos que la BA.

Los primeros indicios de la capacidad morfogenética con relación a otras especies de *Pinus* se observó a los 7 días, el desarrollo de agrupaciones celulares y finalmente la formación de brotes dependió del mantenimiento del estímulo durante un periodo mínimo de 14 días. La prueba morfológica de la presencia de brotes adventicios solo se logró a partir de embriones sometidos por espacio de 24 y hasta 30 días de inducción que posteriormente fueron subcultivados a medio sin reguladores del crecimiento.

El tratamiento con kinetina presentó mayor cantidad de proteínas a los 24 días de cultivo que se reflejó en un mayor número de primordios de brote que finalmente dieron lugar a los brotes adventicios, lo cual se correlaciona con las divisiones periclinales y anticlinales para conformar agrupaciones de 3 a 4 células en la tercera y cuarta capa subepidérmica de los cotiledones para dar lugar a los meristemoides. Estas zonas mostraron reacción positiva tanto para almidón como para proteínas.

Con BA la cantidad de proteínas totales se comenzó a manifestar a los 30 días de inducción y su contenido fue mucho mayor al observado en la formación de meristemoides fue menor en kinetina que en BA y se reflejó en el escaso número final de brotes adventicios obtenidos.

**Bibliografía**

- Allona I, Collada C, Casado R, Aragoncillo C. 1994. Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms. *Electrophoresis* 15: 162-167.
- Berlyn GP, Kohes SJ, Anoro AO. 1991. Caribbean Pine (*Pinus caribaea* Morelet). In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III*, Vol. 16, pp. 254-268. Springer-Verlag, Berlin.
- Bonga JM, von Aderkas P. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 236 p.
- Bonn MC. 1989. A two-dimensional electrophoresis procedure for single meristems of different forest species. *Electrophoresis* 10: 530-532.
- Cheah K-T, T-Y Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured douglas fir cotyledon. *Amer. J. Bot.* 65(8): 845-849.
- Chesick EE, Bergmann BA. 1991. Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.) In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III*, Vol. 16. pp. 241-253. Springer-Verlag, Berlin.
- Davidson NB. 1995. Two dimensional electrophoresis of acidic proteins isolated from ozone-stressed Norway spruce needles (*Picea abies* L. Karst.): Separation method and image processing. *Electrophoresis* 16: 1305-1311.
- Ellis DD, Bilderback DE. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 76: 348-355.
- Flinn BS, Webb D, Newcomb W. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids indeterminant and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Can. J. Bot.* 66: 1556-1565.
- Flinn BS, Roberts D, Taylor I. 1991. Evaluation of somatic embryos of interior spruce. Characterization and developmental regulation of storage proteins. *Physiologia Plantarum* 82:642-632.
- George EF. 1993. *Plant propagation by tissue culture. Haddbook and Directory of Commercial Laboriories. Exegetics Limited, England.* 550 p.
- González MV, Rey M, Tavazza R, La Malfa S, Cuozzo L, Ancora G. 1995. *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *HortScience* 33(4):749-750.
- Gordon AG. (1968). Ecology of *Picea chihuahuana* Martinez. *Ecology* 49(5):880-896.
- Greighton T. (1993). *Proteins structure and molecular properties.* 2<sup>nd</sup>. Edition. W.H. Freeman and Co. New York.
- Harry IS, Thorpe TA. 1994. Regeneration of plantlets though organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37:159-164.
- Jansson E, CH Borman. 1981. *In vitro* initiation of adventitious structures in relation to the abscission zone in needle explants of *Picea abies*: anatomical considerations. *Physiol. Plant.* 53:191-197.
- Jensen WA. 1962. *Botanical Histochemistry-Principles and Practice.* WH Freeman and Co. San Francisco and London.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique.* McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.

- Kirby EG, ME Schalk. 1982. Surface structural analysis of cultured cotyledons of Douglas-fir. *Can. J. Bot.* 60:2729-2733.
- Kolevska-Pletikapić B, Buturović-Derić Z. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plant via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 41: 189-192.
- Krasowski MJ, JN Owens. 1993. Ultrastructural and histochemical postfertilization megagametophyte and zygotic embryo development of white spruce (*Picea glauca*) emphasizing the deposition of seed storage products. *Can. J. Bot.* 71:98-112.
- Ledig FT, Jacob-Cervantes V, Hodgskiss PD, Eguiluz-Piedra T. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution* 51: 1815-1827.
- Lesney MS. 1991. Slash Pine (*Pinus elliottii* Englem.) In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III*, Vol. 16. pp 288-303. Springer-Verlag, Berlin.
- Lyndon RF. 1990. Plant development. The cellular basis. London Unwin Hyman. London 329 p.
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6:427-448.
- Patel KR, Berlyn G. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Can. J. Bot.* 61:575-585.
- PhastGel Silver Kit. 1998. Instruction Manual. Pharmacia AB, Uppsala, Sweden.
- Phillips GC, Gladfelter HJ. 1991. Eldarica Pine, Afghan Pine (*Pinus eldarica* Medw.) In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III*, Vol. 16. pp. 269-287. Springer-Verlag, Berlin.
- Pierce Product Catalog. 1997. BCA Protein Assay Reagent pp.127 -129.
- Rumary C, Patel KR, Thorpe TA. 1986. Plantlet formation in black and white spruce. II. Histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. *Can. J. Bot.* 64: 997-1002.
- Schwarz OJ, Beaty RM, Franco EO. 1991. Egg-cone Pine (*Pinus oocarpa* Schiede) In: Bajaj YPS, (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III*, Vol. 16. pp. 304-316. Springer-Verlag, Berlin,
- Smith PK, Krohu RI, Hermanson GT, Malia AK, Garther FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klent DC. 1985. Measure of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:6-85.
- Thorpe T, Kumar PP. 1993. Cellular control of morphogenesis. In: Ahuja MR. (ed.) *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 1-29.
- Thorpe. TA, Biondi S. 1984. Fibers and Wood. Chapter 16 Conifers. In: Sharp WR, Evans DA, Amirato PV, Yasuda Y. (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species.*, Vol. 2. pp. 435-503. MacMillan Publishers New York.
- Villalobos VM. 1983. The early events associated with organogenesis in cultured radiata pine cotyledons. Tesis Doctoral. University of Calgary, Alberta.
- Villalobos VM, Yeung EC, Thorpe TA. 1985. Origin of adventitious shoot in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63:211-2176.

- von Arnold S, Eriksson T. 1979. Bud induction on isolated needles on Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) grown *in vitro*. Plant Science Letters, 15:363-372.
- von Arnold S, Eriksson T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59: 870-874.
- von Arnold S, Eriksson T. 1985. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. Physiol. Plant. 64:41-47.
- Von Arnold S, Tillberg E. 1987. the influence of cytokinin pulse treatment on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 9:253-261.
- Wagley LM, Gladfelter HJ, Phillips GC. 1987. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. *in vitro*. II. Macro-and micro-photographic evidence of *de novo* regeneration. Plant Cell Reports 6:167-171.
- Webb DT, Flinn BS. 1991. Eastern white Pine (*Pinus strobus* L.) In: Bajaj YPS, (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry Trees III, Vol. 16. pp. 358-382. Springer-Verlag, Berlin.
- Yasuda T, Hasegawa P, Cheng T-Y. 1980. Analysis of newly synthesized proteins during differentiation of cultured Douglas fir cotyledons. Physiol. Plant. 48: 83 – 87.

### *Discusión general*

El cultivo de tejidos vegetales es una importante metodología que permite crear condiciones físicas y químicas conocidas para establecer cultivos capaces de regenerar una gran cantidad de individuos, con potencialidad o características específicas, en un tiempo más corto del que se requeriría por los métodos tradicionales. Pero además nos permite proponer condiciones controladas y explorar procesos biológicos para comprender más sobre la biología de las plantas y los diversos mecanismos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos que se manifiestan en las distintas etapas de su desarrollo.

Entre ellos está la adquisición de la capacidad morfogénica de las plantas, que bajo ciertos estímulos físico-químicos podrá generar una mayor o menor cantidad de individuos nuevos. Esta capacidad variará de acuerdo a la especie y explante que se utilice, se dice que el atributo de generar en mayor o menor cantidad un número considerable de individuos *in vitro* es la manifestación de su capacidad de propagarse en condiciones naturales, por lo que conocer su capacidad morfogénica redundará en clones que podrán rápidamente comercializarse o establecerse en condiciones de invernadero. Desafortunadamente no siempre ésta respuesta se da con facilidad o no se cuenta con suficiente material inicial sobre todo de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción, o en categorías de amenazadas o raras, entre las cuales se puede englobar un gran número de cactáceas, orquídeas, gimnospermas o agaves, por mencionar solo algunas, los cuales por sus características biológicas de lenta o difícil propagación, endemismo o sobre-explotación de sus poblaciones están extinguiéndose y son entonces las técnicas *in vitro*, la alternativa más viable para tratar de conservarlas, aunque en estos casos el número de regenerantes obtenidos sea escaso, estos son altamente significativos por el valor taxonómico y/o ecológico que representa la especie.

Los estudios de la competencia morfogénica requieren de suficiente material biológico que permita realizar diversos ensayos y explorar las repuestas que se presenten.

En *P. chihuahuana* el número de semillas proporcionadas por Bosque Modelo aparentemente en buen estado, estuvieron perforadas o vacías en un alto porcentaje, aún así fue posible determinar el tiempo de exposición mínimo que requiere esta especie para adquirir la competencia y obtener evidencias de ello a partir de estudios histológicos y bioquímicos.

Dentro de la amplia gama de factores a evaluar es importante considerar la historia evolutiva de la especie debido a sus particularidades, como en este caso el de ser una especie relictual y su endemismo extremo, son condiciones que se reflejan *in vitro*.

Budmir y Vujičić (1992) y Kolevska y Butorović (1995), reportaron la formación de brotes y embriones somáticos en *Pinus omorika* (Pančić) Purk. y el trabajo de Stojčić *et al.* (1999) sobre la micropropagación de *Pinus heldreichii* Chist., ambas especies son relictuales del Terciario y endémicas de las montañas altas de la península Balcánica, que al igual que *P. chihuahuana* solo crece en fragmentos del bosque en pequeñas poblaciones aisladas.

Al compara sus resultados con los mejores obtenidos para *P. chihuahuana* (Tabla 1), sobrepasaron en más de dos veces el número de brotes promedio obtenidos con BA y tiempo de inducción de 24 días.

Tabla 1. Comparación del número promedio de brotes obtenidos *in vitro* en dos especies relictuales de Europa en contraste con *P. chihuahuana*.

Especie	Tipo y concentración de regulador del crecimiento (mg l <sup>-1</sup> )		No de brotes promedio
<i>Picea chihuahuana</i>	BA	5	4.91
<i>Picea omorika</i>	BA	5	15.0
<i>Pinus heldreichii</i>	BA	0.5	10.70
	BA	1.0	16.30
<i>Picea chihuahuana</i>	K	5	6.87
<i>Picea omorika</i>	K	1.04	6.60
<i>Pinus heldreichii</i>	K	0.52	5.20

En cambio a bajas concentraciones de kinetina se generó prácticamente la misma cantidad de brotes adventicios en las tres especies, pero se requirió de una más alta concentración para la especie mexicana que para las europeas.

Estos resultados podrían indicar que a pesar de su condición relictual y el estar ubicada igualmente en pequeñas poblaciones aisladas, *Pinus heldreichii* y *Picea omorika* poseen mayor capacidad de respuesta que *Picea chihuahuana* para la BA y para la kinetina, los valores presentados se asemejan a los de las especies de los Balcanes.

Probablemente estas especies son menos "antiguas" desde el punto de vista evolutivo y su agresividad regenerativa no ha disminuido todavía, aunque no hay que descartar que posiblemente dentro de algunas décadas podrían presentar un decremento en su capacidad morfogénica *in vitro*.

Por otro lado, hay que considerar otros factores como son la composición y el efecto del medio de cultivo en los explantes.

La nutrición mineral es un proceso dinámico que involucra un conjunto de pasos que implican la absorción de los iones, la interacción entre los iones y el sustrato, el movimiento de los éstos a través de los tejidos, su toma y asimilación por la planta (Williams, 1992 citado por Debergh *et al.*, 1994). *In vitro* el medio de cultivo proporciona los elementos minerales orgánicos e inorgánicos que se integrarán al tejido y se incorporarán a las células en diversos procesos metabólicos y fisiológicos en el explante.

Es importante evaluar en las diversas formulaciones, las concentraciones de los minerales, la cantidad, el tipo de carbohidrato y los suplementos que se integran en el medio, componentes que a su vez proporcionarán al medio determinadas características de potencial osmótico y fuerza iónica que permitirá la toma de estos elementos por el tejido y la cual finalmente se reflejará en las respuestas morfogénicas (Thorpe y Kumar, 1993).

Wan y Korban (1998) estudiaron en *Pinus sylvestris* el efecto que ejercen siete diferentes medios de cultivo adicionados con tres fuentes de carbono en la inducción de los brotes adventicios. La frecuencia de brotes adventicios generados y la hiperhidratación en las diferentes combinaciones se manifestaron en distintas proporciones en función a la combinación del medio de cultivo y la fuente de carbono.

En este trabajo se emplearon dos medios de cultivo: el B5 modificado para inducir los cultivos y el B5 modificado y SH, ambos al 50% de la concentración de todos sus componentes, para promover la proliferación y la maduración de los brotes adventicios.

Las principales diferencias entre estos medios son la cantidad de nitrógeno y componentes orgánicos que lo conforman (Apéndice II).

El nitrógeno es importante en el metabolismo de las proteínas y aminoácidos y juega un papel en la diferenciación y crecimiento. En los cultivos *in vitro*, el nitrógeno es proporcionado por el nitrato, las sales de amonio, los amino ácidos y los complejos orgánicos como el hidrolizado de caseína. Entre sus efectos está romper la dormancia de las semillas y yemas y liberar la dominancia apical (Bonga y von Aderkas, 1992).

Olgún (comunicación personal) cultivó embriones maduros de *P. chihuahuana* en tres medios diferentes (MS, SH y B5 modificado) y concluyó que el medio SH fue el más favorable, debido a que



influyó en las respuestas morfogénicas, la frecuencia y constitución de los brotes fue mejor que en los otros dos medios de cultivo.

El medio MS ha sido utilizado en cultivos de especies forestales y se ha observado su efecto inhibitorio para el crecimiento y la formación de brotes debido al alto contenido de amonio (Flinn *et al.*, 1986 citado por Bonga y von Aderkas, 1992), para disminuir su efecto se reduce a la mitad o a una cuarta parte sus componentes.

El medio B5 modificado con relación al medio SH contiene más aminoácidos y suplementos orgánicos, y se ha utilizado con éxito en cícadas (Chávez *et al.*, 1992 a,b,c), pero en *P. chihuahuana* las características de este medio de cultivo influyeron negativamente en la frecuencia y el óptimo desarrollo de los brotes adventicios, lo que provocó la pérdida de la integridad del tejido a lo largo del cultivo y durante la formación de los brotes.

Otro de los componentes del medio de cultivo son los reguladores del crecimiento, su concentración, tipo y acción generalmente se evalúa por ensayo y error tomando en cuenta la respuesta morfogénica que se manifieste, la cual varía entre especies, tejidos y explantes. El efecto de los reguladores de crecimiento puede estar relacionado con el estado de desarrollo del tejido, el cual puede alterar su "sensibilidad" al aplicar la hormona y requiere ser modificada en proporción y duración a lo largo del desarrollo de las estructuras generadas *in vitro*.

En coníferas se ha utilizado la BA de forma exitosa para la regeneración múltiple (von Arnold y Eriksson, 1979, 1981; Villalobos, 1985; Villalobos *et al.*, 1984; Thorpe y Biondi, 1984; Ellis y Bilderback, 1989; Flinn *et al.*, 1998; Budmir y Vujčić, 1992; García-Ferriz *et al.*, 1994; Stojčić *et al.*, 1999) y son escasos los trabajos que emplean la kinetina, algunos de ellos son los realizados en *Picea omorika* y *Pinus heldreichii* en los cuales el número de brotes promedio generados frecuentemente son menores a los obtenidos en los ensayos realizados con BA (Budmir y Vujčić, 1992; Stojčić *et al.*, 1999).

Contrario a lo reportado en diversos trabajos con coníferas, en *P. chihuahuana* el mayor número de brotes se obtuvo en los tratamientos con kinetina en comparación con los de BA, Las pruebas bioquímicas corroboraron una mayor cantidad de proteínas totales cuantificadas en los tratamientos con kinetina.

La participación de las proteínas en los procesos morfogénicos son evidentes, se conoce que la inducción de la embriogénesis en cultivos de callos de zanahoria está unida a la aparición de dos nuevas

proteínas específicas para los embriones y a la pérdida de dos proteínas específicas para los callos. Estas proteínas cambiantes son probablemente sintetizadas en las primeras etapas de diferenciación de las células del embrión, ya que en las líneas no embriogénicas no se detectaron y además que no pueden ser manipuladas para producirlas. Aún no está claro si esas proteínas se requieren para la competencia y determinación (Lyndon, 1990).

En coníferas se han realizado estudios para definir que tipo de proteínas y en que momento se encuentran presentes durante los procesos de diferenciación. El trabajo realizado por Yasuda *et al.* (1980) muestra la presencia de proteínas que se sintetizan durante las primeras etapas de la formación de brotes adventicios, así como la supresión en la síntesis de proteínas de bajo peso molecular cuando los explantes fueron transferidos a un medio que no permite la formación de brotes adventicios.

En *P. chihuahuana* fue posible estimar la presencia de proteínas totales en diferentes periodos de inducción, pero la electrofóresis no las separó en bandas y no fue posible establecer su relación con respecto a las diferentes etapas de diferenciación. Aún así se pudo comprobar que la síntesis de proteínas en los explantes que se expusieron a los tratamientos con kinetina fue mayor en comparación con BA, sin embargo es necesario cultivar una mayor cantidad de embriones y obtener biomasa suficiente para llevar a cabo más ensayos.

Con los resultados obtenidos es posible tratar de explicar porqué la kinetina fue más efectiva que la BA, por lo que se puede plantear lo siguiente:

La estructura molecular de la kinetina (6-furfurilaminopurina, PM 215.22) y la BA (6-bencilaminopurina, PM 225.26), están conformadas por un núcleo de adenina con el anillo de purina intacto y sus substituyentes N<sup>6</sup> son de tamaño moderado, se sabe que la citocinina es más activa si la cadena lateral contiene cerca de cinco carbonos y su actividad se incrementa con la presencia de un anillo de benceno o con la cadena lateral insaturada ( de Armas, 1988; Bidwell, 1990).

En este caso la kinetina posee en su cadena lateral cinco carbonos pero la BA posee un grupo benceno, por lo cual la actividad de la BA sería mayor que la kinetina.

Se sabe que las citocininas aplicadas exógenamente son poco móviles y las endógenas parecen tener transporte basipéalo, pero se desconoce el mecanismo y la velocidad (de Armas, 1998).

Probablemente por las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo, la kinetina se mueve o migra con mayor facilidad en tiempos más cortos hacia los tejidos en contraste que la BA y tal vez esta última requiera más tiempo para poder migrar, penetrar en el tejido y expresar la morfogénesis. Para comprobar esto sería necesario exponer a los embriones por lo menos al doble del tiempo de lo ensayado en este estudio.

En embriones de *Pinus heldebrechii*, Stojicic *et al.* (1999) observaron que la mayor formación de brotes se presentó al incrementar el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de BA. Con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  ( $2.22 \mu\text{M}$ ), el número promedio de brotes por explante fue de 10.58 con un tiempo de exposición de 4 semanas y al incrementar la concentración a  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$  ( $22.20 \mu\text{M}$ ) el número de brotes promedio se redujo a 5.61. En ese caso, para esta especie las bajas concentraciones del regulador de crecimiento fueron más efectivas que las altas.

En cambio *P. chihuahuana* requirió de altas concentraciones de citocininas y tiempos de inducción mayores a 2 semanas para que se iniciara la organogénesis.

Diversos estudios han demostrado que existen proteínas que se "unen" a las citocininas y que podrían funcionar como receptores. Una de ellas, la proteína CBF1 (*cytokinin binding factor 1*) extraída de embriones de trigo, la cual está suficientemente caracterizada y se encuentra en niveles abundantes en estos tejidos, sin embargo presenta baja afinidad de unión a la zeatina. Se cree que la función de ésta y otras proteínas similares que se unen a las citocininas, detectadas en las semillas de los cereales, es inhibir la transferencia de citocininas desde el endospermo al embrión de la semilla.

En hojas verdes de cebada, brotes de maíz y hojas de tabaco (Romanov *et al.*, 1988, 1990; Momotani y Tsuji, 1992 citados por Burch y McGaw, 1993), se ha demostrado la presencia de otras proteínas de unión a las citocininas (CBP) (*cytokinin binding proteins*) que parecen ser mejores candidatos para el papel de receptor de citocininas. Las CBP purificadas de brotes de maíz y de tabaco, presentan una alta afinidad para la zeatina y otras bases no conjugadas de citocininas y están presentes a concentraciones menores en comparación con la CBP de las semillas de cereales.

El hecho de que estos probables receptores de citocininas presenten mayor afinidad para las bases libres que para los ribósidos parece apoyar la idea de que la base es la forma activa de las citocininas. A nivel celular las citocininas también parecen tener un efecto directo sobre los niveles de DNA celular y sobre la síntesis de proteínas (Burch y McGaw, 1993).

Por el momento se desconocen los mecanismos mediante los cuales las células detectan o transmiten las señales hormonales (mecanismo de acción), aunque se piensa que este mecanismo implica la unión de la hormona a un receptor protéico específico (Segura, 1993).

La respuesta diferencial entre los dos reguladores de crecimiento se debe probablemente a que los embriones de *P. chihuahuana* poseen alguna proteína específica que se "une" o que tiene mayor afinidad con la kinetina, lo que permite su introducción a la célula, para activar los procesos de síntesis de proteínas y que la división celular sea en períodos más cortos de inducción, en comparación con la BA.

Con base en las observaciones y los resultados obtenidos será pertinente:

Realizar ensayos y modificaciones a los medios de cultivo para hacer más eficiente el sistema de propagación *in vitro*, para ello será conveniente ensayar otros medios de cultivo como el GD (Gresshoff y Doy, 1972), LP (von Arnold y Eriksson, 1978) DCR (Gupta y Durzan, 1985) que han sido reportados para la organogénesis y embriogénesis en pinos.

Obtener un mayor número de regenerantes en tiempos más cortos de cultivo y llevar a cabo ensayos de enraizamiento extensos.

Considerar el origen y las condiciones actuales de las poblaciones

Evaluar la competencia morfogénica de diversas poblaciones de *P. chihuahuana* y poder estimar cual de ellas tienen mayor capacidad regenerativa, ya que probablemente la población con la que se llevó a cabo esta investigación, era o es de las más deterioradas genéticamente aunque fenotípicamente sus semillas son aparentemente mejores en estructura (peso y longitud) que las poblaciones estudiadas por Ortega (1977).

Explorar otras fuentes de explantes como son las yemas vegetativas. Esta opción se llevó a cabo de manera preliminar y fue posible definir que la técnica de desinfección utilizada fue adecuada y que no es necesario adicionar fungicida al medio de cultivo, ya que al parecer ocasiona inhibición en el desarrollo de las yemas. El mayor porcentaje de respuesta se presentó en las yemas completas que en aquellas que se fraccionaron. De un total de 2 572 explantes sembrados el 28% presentó elongación de las hojas y el 2.62% formó callo en los medios con K/2,4-D sin fungicida, tanto en luz como en oscuridad. Sin embargo a pesar de los subcultivos, la necrosis y oxidación limitó su desarrollo. Lo anterior coloca a las yemas

vegetativas como posibles candidatos para obtener respuestas morfogénicas (brotes adventicios y/o embriones), lograr su individualización o germinación.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer bases para continuar con experimentos en donde se realicen modificaciones adecuadas para obtener un mayor número de regenerantes y sea posible conseguir individuos completos y establecerlos en condiciones de invernadero, labor que requiere de extensa y ardua investigación, esto aunado a las diferentes actividades realizadas por Bosque Modelo Chihuahua u otras instancias, encaminadas a la conservación de *Picea chihuahuana*, serán la base de un pequeño fragmento de todos los esfuerzos que se requieren para conservar esta especie, así mismo esta investigación puede ser un modelo para otras especies que puedan estar en peligro de extinción y/o de interés ecológico o económico.

### Conclusiones

El conocimiento generado en este estudio puede aplicarse para evaluar otras poblaciones existentes de *P. chihuahuana*, seleccionar cual de ellas tiene una mayor capacidad de regeneración y potencialmente incrementar el pool genético y la capacidad reproductiva de esta especie en peligro de extinción.

Estas técnicas ofrecen la oportunidad de conservar, probablemente no a la especie, pero si su valioso germoplasma, además de establecer metodologías que nos permitan aplicarlas en otras especies del género.

*Picea chihuahuana* por su condición relictual, su hábitat restringido y específico, sus escasas poblaciones y la remota posibilidad de entrecruzarse la colocan en una situación muy particular lo cual representa un reto para su estudio y conservación.

*Bibliografía*

- Bidwell RGS. 1990. Fisiología Vegetal. AGF Editor SA México. 784 p.
- Bonga JM, Von aderkas P. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer academic Publishers. 236 p.
- Budmir S, Vujičić R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pančić) purk. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:89-94.
- Burch LR, McGaw BA. 1993. Citoquininas. In: Azcon-Bieto J, Talon M. (eds.). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana- McGraw-Hill. España. pp 349-362.
- Chávez VM, Litz RE, Moon PA, Norstog DK. 1992a. Somatic Embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. Robusta (Miq.) Dyer (Cycadales). In Vitro Cell. Dev. Biol. 28:59-63.
- Chávez VM, Litz RE, Norstog DK. 1992b. *In vitro* Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:93-98.
- Chávez VM, Litz RE, Norstog K. 1992c. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:99-105.
- De Armas 1988. Fisiología Vegetal. pp. 247-301. Ed Pueblo . La Habana Cuba. 325 p.
- Debergh P, de Riek J, Matthys D. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. In: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ. (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 19-30.
- Ellis DD, Bilderback E. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. Amer. J. Bot. 76(3):348-355.
- Flinn BS, Webb D, Newcomb W. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. Can. J. Bot. Vol 66: 1556-1565.
- García-Ferriz L, Serrano L, Pardos JA. 1994. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36:135-140.
- Gordon AG. 1968. Ecology of *Picea chihuahuana* Martínez. Ecology 49(5):880-896
- Gresshoff P, Doy C 1972 Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107.161-170.
- Gupta PK, Durzan DJ. 1985. shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep 4:177-179.
- Kolevska-Pletikapić B, Butorocić-Dierić Z. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41:189-192.
- Ledig FT, Jacob-Cervantes V, Hodgskiss P, Eguiluz-Piedra T. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare mexican endemic, Chihuahua spruce, following holocene climatic warming. Evolution 51(6):1815-1827.
- Ortega C. 1997. Fase 2: Comportamiento de varias procedencias de *Picea chihuahuana* Martínez en San Juanito, Chih. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Cd. Madera Chihuahua. 20 p

- Sánchez G, Cano M. 1997. Conservación y aprovechamiento del Pinabete. Fase 1. Detección de áreas potenciales para la propagación de *Picea chihuahuana*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarías. Campo Experimental Cd. Madera, Chihuahua. 26 p.
- Segura J. 1993. Morfogénesis *in vitro*. In: Azcon-Bieto J, Talon M. (eds.). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana-McGraw-Hill. España. Pp 381-392.
- Stojocić D, Budimir S, L. . 1999. Micropropagation of *pinus heldreichii* Plant Cell Tissue and Organ Culture 59:147-150.
- Thorpe TA, Biondi S. 1984. Fibers and Wood. Chapter 16 Conifers. In: Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y. (eds). Handbook of Plant Cell Culture, Crop-Science. Vol. 2: pp 435-503. McMillan Publishers, NY.
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh PC. Zimmerman RH (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 311-335.
- Thorpe TA, Harry IS. 1991. Clonal propagation on conifers. Plant Tissue Culture Manual C3: 1-6. pp. 435-503. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Thorpe TA, Kumar PP. 1993. Cellular control of morphogenesis. In: Ahuja MR (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Press, Netherlands. pp 11-29.
- Villalobos VM, Leung DWM, Thorpe TA. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Physiol. Plant. 61:497-504.
- Villalobos VM, Yeung EC, Thorpe TA. 1985. Origin of adventitious shoot in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. Can. J. Bot. 63:211-2176.
- Villalobos VM. 1983. The early events associated with organogenesis in cultured radiata pine cotyledons. Tesis doctoral, Universidad de Calgary, Alberta.
- von Arnold S, Eriksson T. 1979. Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. Plant Science Letters, 15: 363-372.
- von Arnold S, Eriksson T. 1979. Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. Plant Science Letters, 15: 363 – 372.
- von Arnold S, Eriksson T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* Can. J. Bot. 59: 870-874.
- von Arnold S, Eriksson T. 1985. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. Physiol Plant. 64: 41-47.
- Whan SI, Korban S. 1998. Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 73 (6) 822-827.

## Apéndice I

### *Características morfológicas de Picea chihuahuana*

Árbol que alcanza entre 25 a 30 metros de altura, el diámetro del tronco a la altura del pecho es de 45 a 72 cm, su corteza de 20 mm de espesor es agrietada de superficie escamosa color grisáceo; madera dura, blanquizca, algo resinosa; ramas inferiores comienzan desde los 2 a 5 metros de altura sobre el suelo y son casi horizontales, mientras que las superiores son extendidas y algo levantadas, formando una copa cónica; ramas opuestas, a veces bifurcadas, muy ásperas y de color amarillento; yemas terminales, en grupos de tres, ovoide-acuminadas, de 7 a 8 mm, con las brácteas apretadas, ovadas u ovals, de borde laciniado, en la base brácteas pequeñas y largamente acuminadas; hojas solitarias, cuadrangulares, rectas o levemente falcadas, verde claro de 15 a 21 mm de largo por 1.7 mm de ancho, rígidas, con el ápice agudo, córneo y punzante; colocadas sobre la prolongación de un cojinete recurrente, en seco se desprenden fácilmente; dispuestas en espiral y se orientan hacia la extremidad de las ramas, 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.

Conos femeninos terminales o subterminales, cilíndricos o cilíndricos-oblongos, rectos o a veces algo encorvados, levemente atenuados en la extremidad y romos; pueden estar solitarios o por pares de tres a cuatro, de color castaño brillante, de 10.5 a 14 cm de largo por 4 de diámetro (abiertos), sobre pedúnculos fuertes y encorvados, de unos 10 mm; escamas numerosas (150 aproximadamente); delgadas, coriáceo-leñosas, persistentes; obovado-cuneadas, convexas hacia arriba y aplanadas y oscuras hacia la base, borde superior redondeado y entero; de 20 a 22 mm de largo por 17 a 19 de ancho, con una bráctea dorsal de 4 a 5 mm de longitud, irregularmente oval, de color castaño brillante con el borde erosivo, gruesamente laciniado; semilla elíptica, subangulosa, atenuada en la base de color pardo oscuro, con ala casi oval, de 15 a 17 mm de largo incluyendo la semilla, por 3.5 de ancho tienen una longitud promedio de 3.8 mm, son dos en cada escama y están provistas de ala, la semilla con el ala mide en promedio 12.5 mm.

En promedio hay 283 semillas por gramo y el peso de 1000 semillas es de 3.56 gramos (Gordon, 1968).



## Apéndice II

### Formulación de los medios de cultivo

#### Medio de cultivo basal, B5 modificado

Macronutrientes	mg·l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	2500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150
Micronutrientes	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
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
Solución de Hierro -EDTA	
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
Vitaminas	
Acido nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.50
Tiamina-HCl	0.10
Inositol	100
Glicina	200
Aminoácidos	
L-Glutamina	400
Acido ascórbico	100
Hidrolizado de caseína	100
L-Arginina	100
L-Asparagina	100
Sacarosa	60 000
Agar	900
ph	5.7-5.8

Medio de cultivo Schenk y Hildebrandt (1972), modificado por Reilly y Washer (1977).

Macronutrientes	mg·l <sup>-1</sup>
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>	400
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200
Micronutrientes	
KI	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20
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
Solución de Hierro -EDTA	
Na <sub>2</sub> EDTA	15
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20
Vitaminas	
Acido nicotínico	5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	5
Inositol	100
Sacarosa	30 000
Agar	8 000
ph	5.7-5.8
Adicionar por filtración	
Acido ascórbico	250
Acido cítrico	250

ANO 1 NÚMERO 1 CHIHUAHUA, MAYO DE 1995

# Voces del bosque



**V**oces del bosque confía en convertirse en la tribuna y foro, o simplemente en el portavoz de los habitantes del bosque respecto a su forma de convivir con su medio ambiente, ese espacio tan importante para toda sociedad. Porque en cualquier actividad humana, tratamos de visualizar o encontrar un elemento clave, que significa en la mayoría de los casos la llave de la que dependen acciones y procesos.

En el caso de *Bosque Modelo*, como promotor del *desarrollo sustentable*, es claro que el elemento clave es el hombre, que actúa como agente modificador de los demás elementos con los que interactúa, en muchos casos modificando el medio ambiente de manera irreversible en su afán de supervivencia.

Por eso el reto que enfrentamos quienes integramos el equipo de *Bosque Modelo* es lograr un desarrollo en armonía con un medio ambiente que nos proporciona todos los elementos para esa supervivencia y para alcanzar una calidad de vida siempre mejor.

En este momento clave, el hombre requiere de información y conocimiento para obtener, con el tiempo, una *cultura del desarrollo sustentable*, es decir, un aprovechamiento y conservación de los recursos naturales en provecho de las generaciones actuales y futuras.

De igual forma, *Voces del bosque* pretende ser el medio de comunicación disponible para todos aquellos que están conscientes de que este ecosistema del bosque debe ser conservado, utilizado y protegido de una manera balanceada, armónica y responsable, ya que el desarrollo sustentable considera a toda la sociedad en general.

Gustavo Heredia  
Gerente de Bosque Modelo Chihuahua



COOPERACIÓN ENTRE CANADÁ Y MÉXICO  
EN DESARROLLO SUSTENTABLE DE BOSQUES



## SOS ESPECIES EN PELIGRO

### Protección de la *Picea Chihuahuana*

¿Usted tal vez ni se imagina que en su región existen plantas y animales que están a punto de desaparecer de este planeta...

Tal es el caso de la conífera llamada *Picea Chihuahuana*, que sólo se encuentra en territorio mexicano en los estados de Chihuahua y Durango. La región de Creel y San Juanito, ubicada en la sierra Tarahumara, es el lugar preciso donde esta especie encuentra su hogar ideal.

El número de árboles de esta especie es actualmente muy reducido; apenas 40 mil en todo el mundo. Esto nos obliga a proteger esta forma de vida para conservar la maravillosa diversidad biológica que tenemos. Por eso el *Bosque Modelo* busca salvar esta especie de un destino de muerte, y para ello realiza actividades como:

Conservación del hábitat, es decir, preservar las condiciones y el medio ambiente donde mejor se reproduce, como El Ranchito y Arareco.

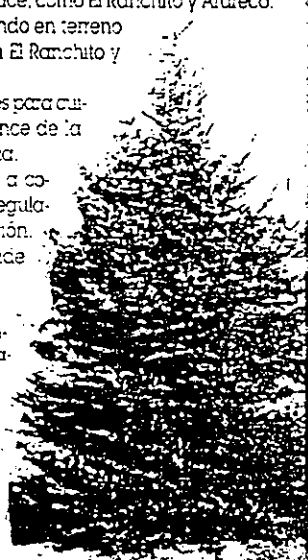
Reforestación de la especie plantando en terreno y cultivando en viveros ubicados en El Ranchito y Arareco miles de piceas.

Protección, cercando las plantaciones para cuidar que las piceas no estén al alcance de la fauna nociva, el vandalismo o la tala.

Educación e información, para dar a conocer el valor de esta especie y las regulaciones que existen para su protección.

También señalizando los lugares donde se protege y se conserva.

■ ¿Sabías que en México existen cientos de especies que se encuentran catalogadas como amenazadas, raras o en peligro de extinción? ■ ¿Sabías que existe un decreto que prohíbe el uso de estas especies y que es ilegal cualquier forma de aprovechamiento? Te invitamos a que te informes más sobre estos temas. Todos tenemos la responsabilidad de proteger la vida en todas sus formas. ¡Ayúdanos!



PICEA CHIHUAHUANA...  
O PINABETE ESPINOSO  
ES UN EJEMPLAR  
QUE ALCANZA  
HASTA 50 METROS  
DE ALTURA!



SUS POBLACIONES  
SON MUY BELLAS  
Y HUMEDAS...

EL TÍPICO  
BOSQUE DE  
ANTES



... ESAS DE  
NIEBLA Y  
TODA LA COSA.

SON ARBOLES  
EN FORMA  
DE CONITO.



DESDE  
CHIQUETOS  
LEVAN ESA  
FORMA.

ESA ES SU  
DESGRACIA



POR ESO  
AÑO CON AÑO  
SON CORTADOS  
INDEBIDAMENTE  
CIENTOS DE ELLOS.



TANTO AÑO  
PA' ALCANZAR  
ESTE TAMAÑO...



...TANTA BELLEZA  
QUE DAMOS AL  
BOSQUE...

GHULADAY!



... TANTO RÍO  
QUE PROTEGEMOS..

... PARA IR A  
ACABAR ASI!



¡QUE ONDA!  
POS QUE DE  
MALO HACEMOS  
PA' ACABAR ASI!

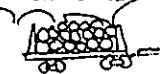


AÑO CON AÑO  
DISMINUYE LA  
POBLACION DE  
PICEA...



... AÑO CON AÑO  
SON CORTADOS  
CIENTOS TANTOS  
MÁS PARA  
CELULOSA.

ADIO POS  
TABAN SECOS



SI ES CIERTO,  
SON ARBOLES  
SECOS.

¡EVELE ESA  
CINCHADA  
'STA RE'SUAVE!



ES CIERTO!  
ESTA ESPECIE  
SE EXTINGUE.  
SE ACABA.

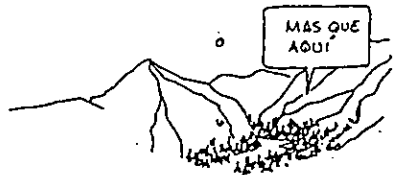


SI AL MEJOS  
TUUIERA YO  
PATITAS

¡ VAMOS A  
DESAPARECER !



PUES APARTE  
DE QUE NO  
CRECEMOS EN  
OTRO LADO ...



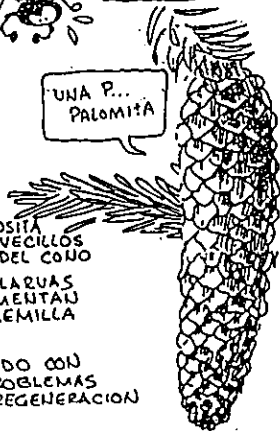
MAS QUE  
AQUI

¡ LAS PLAGAS  
NOS ACABAN !



VOY CON  
MI HACHA

'UNA P...  
PALOMITA'



QUE DEPOSITA  
SUS HUEVECILLOS  
DENTRO DEL CONO  
Y LAS LARVAS  
SE ALIMENTAN  
DE LA SEMILLA

TRABEJANDO CON  
ESTO PROBLEMAS  
EN LA REGENERACION

DEL HOMBRE  
DEPENDE TODO .



¿ PUES QUE  
DAÑO HAGO  
YO PARA QUE  
SE ME ATAQUE ?

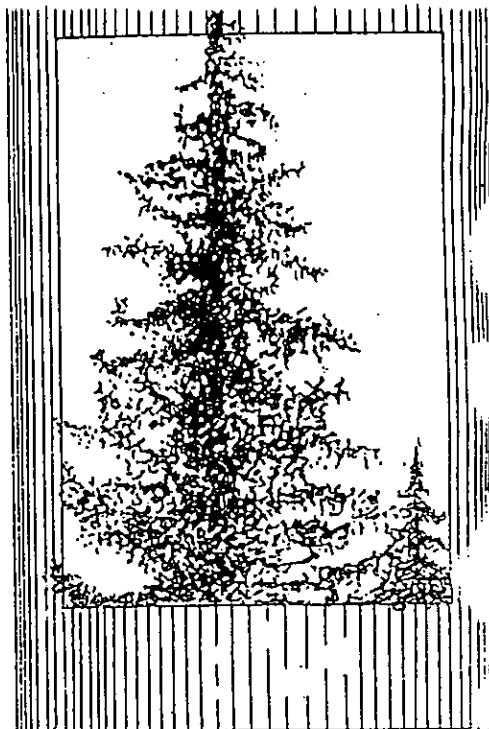
DEL HOMBRE  
DEPENDE TODO .

YO NO PUEDO  
DEFENDERME .  
SI PODIERA  
LO HARIA .



LECTOR - HASTA 1984, EN CHIHUAHUA  
Y DURANGO EXISTIAN CERCA DE  
17.000 ARBOLES . EN LA ACTUALIDAD ;  
¿ CUANTOS QUEDARÁN EN PIE ?

**!!PROTEJAMOSLO!!**



PINABETE ESPINOSO

MATEGO

Picea chihuahuana

UN ARBOL  
QUE SE NOS VA

SARH SSF  
SUBDELEGACION FORESTAL  
UNIDAD DE CONSERVACION  
Y DESARROLLO FORESTAL N°5  
SAN JUANITO CREEL CHIHUAHUA