

110



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Inducción de respuestas morfogenéticas in vitro en Magnolia dealbata Zucc. y M. grandiflora L."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JOSE ANGEL JIMENEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARTIN MATA ROSAS
CODIRECTOR: DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA



2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Inducción de respuestas morfogenéticas in vitro en Magnolia dealbata Zucc.
y M. grandiflora L."
realizado por José Angel Jiménez Rodríguez

con número de cuenta 9355006-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Martín Mata Rosas
Co-director
Propietario Dr. Víctor Manuel Chávez Avila
Propietario M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano
Suplente Biol. Ana Claudia Sánchez Espinoza
Suplente Dra. Teresita del Niño Jesús Marín Hernández

Juan Manuel Rodríguez Chávez
Marta
Victoria
Juana Mabel Hernández
Ana Claudia Sánchez Espinoza
Teresita del Niño Jesús Marín Hernández

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mis padres Margarita Rodríguez y Guilebaldo Jiménez por creer en mí, por toda su confianza y apoyo, por permitirme siempre hacer las cosas en las que yo creo, por darme la herencia tan valiosa de mi educación y por estar siempre conmigo.

A mis hermanos Ramón, Manuel y Fernando

A Beatriz Romero por tu cariño, por estar siempre conmigo, por tu estímulo para hacer las cosas siempre más pronto y mejores; por compartir tu vida conmigo.

A mi sobrino Alberto Jiménez Ortiz... a su inocencia.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Martín Mata Rosas por la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por compartir la experiencia de iniciar nuevos proyectos en nuevas instituciones, pero sobre todo por el decidido apoyo y amistad sin medida que siempre me brindó.

Agradezco infinitamente al Dr. Víctor Chávez por su valiosa dirección en mi trabajo, por sus consejos y las oportunidades que siempre me ha ofrecido, por permitirme aprender muchos otros aspectos vinculados a la investigación, pero por sobre todas las cosas por su gran amistad y apoyo siempre incondicional.

A los sinodales: M. en C. Mabel Hernández Altamirano; Biol. Claudia Sánchez Espinosa; Dra. Teresita del Niño Jesús Marín Hernández por sus valiosos comentarios y aportaciones a mi trabajo.

Un agradecimientos muy especial al Instituto de Ecología, A.C. por el apoyo económico recibido a través de la Beca expedida por CONACYT, la cual contribuyó a llevar acabo este trabajo de investigación en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Genética del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de este instituto.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM, por facilitar sus instalaciones para la realización del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros del Jardín Botánico UNAM, Mario Monroy, Linda Balcázar, Claudia Sánchez, Katja Moebius, Bárbara Estrada, Gabriel Olalde, Estela Sandoval, Marco Antonio García, Florencia Briones, Octavio González; de igual forma a los compañeros del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero, Víctor Luna y Nadia con quienes siempre encontré apoyo y compartimos momentos muy agradables.

Al M. en C. Mario Arce por su estímulo para terminar este trabajo

- Agradezco a mis padres por su cariño y apoyo, por estar siempre al pendiente de mi vida.
- A los señores Eugenia Hernández y Trinidad Romero porque con su comprensión, apoyo y confianza han contribuido a concluir este trabajo.
- A mis viejos amigos: Alberto Guevara, Oscar Flores, Blas Gómez, Jesús Flores y Francisco Macal en donde quiera que te encuentres.
- Un agradecimiento muy especial a Sara Romero y Miguel Angel Lujan, porque sin su apoyo y amistad no se hubiera podido terminar esta tesis.
- A la señora Elba Santos; a Magdalena y Gonzalo Romero por su amistad
- A mis hermanos Ramón, Antonio, Magnolia, Hermenegildo, Manuel y Fernando por apoyarme y crecer conmigo.
- Finalmente mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a Beatriz Romero por el gran amor y apoyo incondicional que me ha brindado para terminar este trabajo y para emprender los cambios necesarios para continuar nuestras vidas.

ÍNDICE

Páginas

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
Ubicación taxonómica de <i>M. dealbata</i>	8
Descripción de <i>M. dealbata</i>	8
Generalidades de <i>M. dealbata</i>	9
Ubicación taxonómica de <i>M. grandiflora</i>	12
Descripción de <i>M. grandiflora</i>	12
Generalidades de <i>M. grandiflora</i>	14
Conservación de los Recursos Vegetales	16
Conservación <i>in situ</i>	16
Conservación <i>ex situ</i>	17
Cultivo de Tejidos Vegetales	21
Vías de regeneración <i>in vitro</i>	22
Elongación de brotes axilares	22
Embriogénesis somática	22
Embriogénesis somática directa	23
Embriogénesis somática indirecta	23
Organogénesis	24
Organogénesis directa	24
Organogénesis indirecta	25
Cultivo de Tejidos Vegetales en Angiospermas	26
Propagación Convencional de Magnolias	29
Propagación por semilla	29
Propagación vegetativa	29
Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Magnoliaceae	31
Importancia de los procesos oxidativos en el cultivo <i>in vitro</i> y alternativas para contrarrestarlos	33

JUSTIFICACIÓN	36
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
RESULTADOS	45
Germinación de embriones cigóticos de <i>M. grandiflora</i> en medio MM	45
Cultivo de embriones cigóticos de <i>M. grandiflora</i>	47
Cultivo de embriones cigóticos de <i>M. dealbata</i>	50
Cultivo de embriones de <i>M. dealbata</i> en medio MM.	50
Cultivo de embriones de <i>M. dealbata</i> en medio WP.	51
Cultivo de yemas apicales y laterales de <i>M. grandiflora</i> en medio MM	55
Cultivo de yemas apicales de <i>M. grandiflora</i> en medio WP	57
Cultivo de yemas laterales de <i>M. grandiflora</i> en medio WP	59
Cultivo de yemas apicales de <i>M. dealbata</i> en medio WP	60
Cultivo de yemas laterales de <i>M. dealbata</i> en medio WP	62
Cultivo de hojas de <i>M. grandiflora</i> en medio MM	62
Cultivo de hojas de <i>M. grandiflora</i> en medio WP	65
Cultivo de hojas de <i>M. dealbata</i> en medio WP	67
Cultivo de secciones de hoja de <i>M. dealbata</i> en medio WP adicionado de BAP/K/2,4-D.	70
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	82
APÉNDICES	84
BIBLIOGRAFÍA	87

ABREVIATURAS.

AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido naftalen acético
BA	Bencil adenina
BAP	6-Bencil aminopurina
K	Kinetina
2,4-D	Acido 2,4 diclorofenoxiacético
MM	Medio de Cultivo para <i>Liriodendron tulipifera</i> (Merkle y Sommer, 1991)
WP	Woody Plant Medium Lloyd y McCown (1981)
E.S.	Embriogénesis Somática
O.D.	Organogénesis Directa
O.I.	Organogénesis Indirecta.
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora International Union Conservation of Nature
FAO	Food and Agriculture Organization
SEMARNAT	Secretaria de Marina y Recursos Naturales
IUCN	International Union Conservation of Nature

"Inducción de respuestas morfogénéticas *in vitro* en *Magnolia dealbata* Zucc. y *M. grandiflora* L."

RESUMEN

La creciente degradación y erosión genética de los ecosistemas ocasionadas por las actividades humanas ponen en riesgo de extinción a la mayor parte de los recursos vegetales que componen ecosistemas como el bosque mesófilo de montaña; ante tal situación, resulta de vital importancia proponer mecanismos cada vez mas eficientes que permitan la conservación *in situ* y *ex situ* de las poblaciones vegetales. La conservación de especies como *Magnolia dealbata* y *M. grandiflora* a través del Cultivo de Tejidos Vegetales es uno de los mecanismos que contribuyen a la conservación de los recursos vegetales.

Magnolia dealbata es un árbol de los bosques mesófilos de montaña en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz; el área de distribución natural de *M. dealbata* ha sido en su mayoría transformada a cultivos y pastizales ocasionando que su distribución sea muy restringida, por lo que esta especie se encuentra en peligro de extinción (Anónimo, 2002) y en la categoría de Endangered en la lista de IUCN.

M. grandiflora es una especie nativa del sureste de Estados Unidos, se distribuye a lo largo de la costa del Atlántico y se extiende hasta el Caribe, en México está considerada como una especie amenazada por las leyes Mexicanas (Anónimo, 2002). *M. grandiflora* es usada en la medicina tradicional sobre todo en el centro del país y es muy apreciada como planta de ornato.

La germinación *in vitro* de embriones cigóticos maduros de *M. grandiflora* fue exitosa, al obtener porcentajes de 60 a 80% en el medio de cultivo MM.

La combinación de los reguladores del crecimiento BAP/2,4-D (0.25/2 mg/l) permitió la formación de brotes y raíces por organogénesis indirecta al cultivar embriones cigóticos maduros y yemas apicales de *M. grandiflora* en el medio de cultivo MM.

A partir de embriones cigóticos maduros de *M. dealbata* se logró inducir embriogénesis somática directa e indirecta en el medio de cultivo WP adicionado con 2,4-D (0.5 y 1.0 mg/l); se logró la formación de brotes y raíces por organogénesis directa e indirecta, principalmente en los tratamientos con 3 y 5 mg/l de BAP en combinación de 0.0 y 0.1 mg/l de 2,4-D.

La oxidación y necrosis fue un limitante en el desarrollo de los cultivos, éste proceso se logró reducir de forma significativa en algunos casos mediante la aplicación de Polivinilpirrolidona (5g/l), la reducción de la temperatura de incubación y la intensidad del flujo fotónico en el fotoperiodo.

El alto potencial regenerativo de *Magnolia dealbata* explorado en este trabajo confirma que el Cultivo de Tejidos Vegetales es una valiosa e indispensable herramienta en la conservación de esta y de otras especies amenazadas o en peligro de extinción.

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad se reportan tasas de deforestación en regiones tropicales y subtropicales (bosque templado-húmedo) que van de los 10 a 17 millones de hectáreas al año (Heywood, 1992, Reid, 1992). Datos de la Food and Agriculture Organization (FAO), International Union Conservation of Nature (IUCN), Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), así como en estudios realizados por Toledo (1988), Ecker (1989), Vovides (1989), Wilson (1989), Ehrlich y Wilson (1991), Heywood (1992), Pavlik *et al.* (1993), Caro y Laurenson (1994) y Frankham (1995) entre otros, identifican y reconocen aquellos factores que intervienen en la destrucción de los ecosistemas y por tanto en la reducción de la diversidad biológica mundial, coincidiendo en que las actividades humanas, de manera directa o indirecta, son las que en mayor proporción están provocando la extinción de un gran número de especies en el mundo; actividades que se pueden resumir en: a) deforestación debida a la tala y quema de bosques y selvas para ampliar las áreas agrícolas, ganaderas y urbanas ante el explosivo crecimiento de la población humana b) contaminación de cuerpos de agua (ríos, lagos, océanos), suelos y atmósfera, por la quema de combustibles fósiles e industriales y c) saqueo y tráfico de plantas y animales.

En México la situación no es diferente ya que existe un deterioro ecológico en casi todos sus ecosistemas, los bosques mesófilos de montaña no son la excepción, las especies de este ecosistema están viendo rápidamente reducida su distribución resultado sin duda de la tala inmoderada para abrir áreas nuevas para la ganadería y la agricultura extensiva de autoconsumo que ha aumentado de forma alarmante como resultado del incremento de la pobreza en los últimos años, derivada de las políticas económicas seguidas. Ante tal situación, resulta de vital importancia proponer mecanismos más eficientes que permitan la conservación de los recursos genéticos de las poblaciones vegetales que componen estos ecosistemas.

En México aún no existen programas de control para extraer de forma controlada especies maderables, medicinales u ornamentales de bosques tropicales, bosques templados o de bosques mesófilos de montaña por lo que se sigue reduciendo el área de distribución de muchas especies, como en el

caso de *Magnolia dealbata*, la cual se encuentran restringida a poblaciones muy reducidas.

Ante aquellos factores que intervienen en la destrucción de los ecosistemas el uso sustentable de nuestros recursos naturales es sin lugar a dudas una meta urgente de alcanzar para reducir el peligro de extinción que enfrentan numerosas especies.

Desde el siglo pasado a finales de los años 60 las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) han mostrado ser una alternativa efectiva para la propagación comercial de plantas de interés agrícola, industrial y medicinal (Murashige, 1978); sólo hace pocos años se ha orientado a especies amenazadas y en peligro de extinción o aquellas que presentan problemas particulares en su reproducción (Chávez, 1993; Mata, 2000).

El creciente interés en propagar especies arbóreas mediante CTV está basado en las ventajas en tiempo y manejo del material biológico, dado que estas especies generalmente presentan ciclos de vida largos, los cuales podrían disminuirse de manera significativa al emplearse las técnicas de CTV como en los casos de: *Carica papaya* que ha sido micropropagada a través de la proliferación de brotes adventicios (Litz, 1986; Rajeevan y Pandey, 1986; De Winnaar, 1988; Drew, 1988; Reuveni *et al.*, 1990 y Drew *et al.*, 1991) y de embriogénesis somática, obteniendo plantas, a partir de embriones cigóticos en medio de cultivo MS adicionado de 10 mg/l de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Ficht y Manshardt, 1990; Ficht, 1991, 1993); *Prunus persica* es micropropagada de forma masiva a partir de brotes apicales, yemas apicales y secciones de nudos en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 8 a 25 μM de Bencil adenina (BA) y 0.05 μM de ácido indol butírico (AIB) (Reeves y Couvillon, 1992). Un método de producción clonal de *Liquidambar styraciflua* es la proliferación de numerosos brotes a través de organogénesis directa teniendo como fuente de explantes hojas, secciones de peciolo y meristemos (Brand y Lineberger, 1988) en medio de cultivo Woody Plant (WP) (Lloyd y McCown, 1980) adicionado con 2.5 mg/l de BA y 0.1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) o bien libre de auxina (Brand y Lineberger, 1992). Dentro de la familia Magnoliaceae sólo en algunas especies como *Liriodendron tulipifera*, se han podido establecer cultivos embriogénicos a partir de embriones cigóticos inmaduros en el medio de cultivo modificado de Blayde (Witham *et al.*, 1971)

adicionado de 0.25 mg/l de BAP, 2 mg/l de 2,4-D y 1 g/l de Hidrolizado de Caseína (Merkle y Sommer 1986, 1991; Merkle, 1995), así como en *Magnolia cordata*, *M. fraseri* y *M. virginiana* (Merkle y Wiecko, 1990; Merkle, 1995).

La aplicación del CTV a especies como *M. dealbata* y *M. grandiflora* podrían incrementar las probabilidades para su conservación ya que hasta hoy los métodos de propagación convencionales, así como la conservación en sus ambientes naturales han sido muy limitados y con poco éxito.

ANTECEDENTES.

En las últimas cuatro décadas la degradación ambiental, especialmente en el mundo tropical, nos ha concientizado acerca de la necesidad de conservar y dar un mejor manejo a los recursos biológicos del planeta, otorgando así mayor importancia al conocimiento generado en universidades e instituciones de investigación en recursos naturales a fin de preservarlos (Villalobos, 1987; Toledo, 1988; Wilson, 1989; CIAT, 2001). Sin embargo, las múltiples actividades humanas siguen provocando la destrucción de ecosistemas. México es uno de los países más atrasados en la implementación y aplicación de políticas de conservación de sus recursos naturales (Toledo, 1988).

En México se alberga más del 12% de la diversidad biológica mundial debido a su posición geográfica, topográfica y climática (Toledo, 1988) y es el 3^{er} país en diversidad biológica, tan sólo por debajo de Brasil, Colombia y precediendo a Indonesia, Madagascar, Zaire y Australia (Toledo y Ordoñez, 1998). México presenta entre el 10-12% del total de especies de plantas vasculares (Toledo, 1988) con aproximadamente 11,440 especies endémicas lo que alcanza el 52% de las plantas vasculares, en un área mucho menor a la de países como China, la ex-Unión Soviética y Estados Unidos los cuales presentan una cantidad inferior de riqueza de especies en sus territorios (Rzedowski, 1993).

Las especies endémicas de plantas y animales son los organismos que más atraen a aquellos que se ocupan de conservar la diversidad biológica, lo que conlleva a la necesidad de proteger estas especies que presentan una distribución muy restringida, o bien poblaciones muy pequeñas que las ponen aún en más riesgo y vulnerabilidad ante patógenos u otros fenómenos (Toledo, 1988).

México alberga un gran número de especies endémicas, amenazadas o en peligro de extinción, entre ellas se encuentran *Magnolia dealbata* y *M. grandiflora* las cuales están bajo protección de las leyes mexicanas, la primera se cataloga en peligro de extinción y la segunda como amenazada.

Las magnolias son árboles y arbustos llamadas así en honor a Pierre Magnol, profesor francés de botánica y medicina (Spongberg, 1976). Esta familia fue descrita por Jussien en 1789 (Gutiérrez, 1993), la familia

Magnoliaceae se compone de 2 subfamilias y 9 géneros siendo el género *Magnolia* el más numeroso con 80 especies (Takhtajan, 1967).

Ubicación taxonómica (Takhtajan 1967)

REINO	Vegetal
DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Magnoliales
FAMILIA	Magnoliaceae
SUBFAMILIA	Magnoliadeae
GENERO	<i>Magnolia</i>
ESPECIE	<i>Magnolia dealbata</i> .

Nombre común: Eloxochitl, Cow-Cumber

Descripción *Magnolia dealbata* Zuccarini (1837).

Arboles de 4.5 a 5.5 m de altura; de hojas simples, forma obovada u oblonga; papiráceas; de color verde el haz y blanco el envés, de 35 a 50 cm de largo por 24 a 27 cm de ancho; glabras en el haz, con escaso indumento de tipo seríceo blanco en el envés. Margen entero, ápice agudo u obtuso base cordada, nervación reticulada, con la nervadura central muy prominente por el envés, a todo lo largo de la hoja, peciolo de 8 a 10 cm de longitud, con 2 líneas de cicatrices a todo lo largo, estípulas unidas a la parte ventral del peciolo, dejando 2 líneas de cicatrices a lo largo de éste.

Flores bisexuales, estambres numerosos; arreglados en espiral sobre el andróforo, de 1.3 cm de largo, gineceo sésil de forma ovada, con numerosos pistilos arreglados en espiral sobre un eje alargado, de 5.5 cm de largo; ovarios separados, de 1.4 a 1.5 cm de longitud; estilo recurvado en el ápice de 4 a 5 mm de longitud, con el estigma sobre su cara interna.

Ecología de *M. dealbata*.

Se localiza en climas templados del tipo C (cálido) y en el subgrupo semicálido AC (García, 1964 y 1970) *M. dealbata* soporta temperaturas medias anuales de 16 a 22 °C. Los subtipos de climas en que se encuentra son: C (fm) y el (A) C (m). templado-húmedo con lluvias todo el año (García, 1964 y 1970). En cuanto a las condiciones de temperatura en el verano, en las localidades donde se distribuye esta especie son de 2 tipos: localidades cuyo mes más caliente está sobre 22°C y localidades cuyo mes más caliente es menor de 22°C. El número de días con precipitación apreciable en las localidades en donde se distribuye la especie es alto, ya que poco más de la mitad de los días del año se presentan precipitaciones apreciables, además de que en 20 a 40 días más, la precipitación no es apreciable; así la precipitación es de 48 a 52% de días del año con precipitación (Hernández-Cerda 1980).

El periodo de floración es durante los meses de marzo a mayo y la dispersión de las semillas se da en los meses de agosto a octubre. Los frutos inmaduros se encuentran en el árbol desde el mes de julio. Su polinización es de tipo entomófila, por coleópteros y por himenópteros.

Generalidades de *M. dealbata*

M. dealbata es un árbol raro del bosque mesófilo de montaña en la Sierra Madre Oriental y en la Sierra de Oaxaca en el trópico mexicano. El mayor atractivo de *M. dealbata* lo constituye el gran tamaño de sus hojas de hasta 50 cm de longitud y en algunos casos un poco mayor, las cuales sobresalen del resto de las otras especies arbóreas (Figura 1), las cuales son generalmente pequeñas y al igual que *M. dealbata* son deciduas (Gutiérrez, 1993).

M. dealbata fue descrita por Francisco Hernández en el siglo XVI. Para la ciencia esta especie fue colectada y descrita por Zuccarini en 1837 quien la señala presente en las selvas tropicales mexicanas, después de esta descripción durante cien años no se volvió a saber de ella hasta 1960 cuando fue colectada y determinada por Rzedowski en el estado de Hidalgo (Gutiérrez, 1993), "el redescubrimiento de una especie arbórea que se creía extinta representa una opción mas para la humanidad" (Vovides, 1981).



Figura 1. Arbol adulto de *M. dealbata* de la población de Coyopola Mpio. Ixhuacán de los Reyes, Veracruz. Especie en peligro de extinción de los bosques mesófilos de montaña.

El área de distribución natural de *M. dealbata* ha sido en su mayoría transformada a cultivos y pastizales, ocasionando que su distribución de por sí restringida a ciertas áreas, quede aún más limitada a manchones semiperturbados, en terrenos con pendientes abruptas, al borde de arroyuelos donde la relativa inaccesibilidad de estos microambientes ha permitido conservar pocos individuos.

En la actualidad *M. dealbata* se encuentra restringida a poblaciones muy reducidas en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz (Hernández-Cerda, 1976, 1980; NOM-ECOL 1989; Vázquez, 1990, 1994; Gutiérrez, 1993; Gutiérrez y Vovides, 1997; IUCN 1994), siendo en este último estado de la república en donde se encuentran las poblaciones mejor estudiadas, algunas de estas se componen de 6-10 individuos y sólo en la población de Coyopola, municipio de Ixhuacán de los Reyes, Ver. se encuentran poblaciones con cerca de 80 organismos (Gutiérrez, 1993; Gutiérrez y Vovides, 1997). Debido a su reducido número y limitada distribución

esta especie se encuentra en peligro de extinción (Anónimo, 2002) y en la categoría de Endangered en la lista de IUCN (Hilton-Taylor, 2000).

M. dealbata se creía extinta por lo que el conocimiento sobre ella es muy limitado y existen muy pocos trabajos respecto a ella pese a ser una especie nativa y endémica de México, las investigaciones al respecto se refieren a reportes de su redescubrimiento (Dood, 1980, Pattison, 1986), así como los estudios taxonómicos como los de Hernández-Cerda (1980), Johnson (1989) y el de Vázquez (1990, 1994.) quien realizó una amplia revisión al género *Magnolia* en México y Centroamérica.

Los estudios taxonómicos tempranos de *M. dealbata* no están ampliamente analizados como en otras especies incluso del mismo género, sin embargo, la mayoría de las investigaciones muestran que las magnolias conservan estructuras primitivas (como lo son los grandes y numerosos estambres laminares y el reducido tamaño del embrión), por lo que representan un gran interés de estudio evolutivo, taxonómico y ecológico, así como de importancia ornamental y en la medicina tradicional ya que es una especie de uso medicinal amplio y antiguo, sobre todo en el centro y sureste del país, en Hidalgo, San Luis Potosí y Veracruz, se emplea principalmente para tratar padecimientos del corazón y para aliviar malestares estomacales (Hernández-Cerda, 1976; Gutiérrez, 1993)

M. dealbata es una especie no cultivada (Treseder, 1978); Russel (1983) colectó semillas en la localidad de Coyopola Ver. y en colaboración con el Dr. Pattison, realizaron ensayos de germinación obteniendo sólo 50 plántulas después de 2 o 3 semanas. Posteriormente Pattison (1986) realizó otra colecta de semillas, sin embargo no obtuvo resultados favorables, de igual forma señaló que la propagación vegetativa no fue exitosa (Gutiérrez, 1993). Vovides e Iglesias (1996) realizaron un estudio acerca de la germinación en esta especie; encontrando que las semillas tienen un porcentaje de germinación muy bajo y errático, además de que pierden rápidamente su viabilidad.

Una forma de promover la conservación de *M. dealbata* ha sido su cultivo en colecciones botánicas y jardines, Pattison (1986), Vovides e Iglesias (1996) contribuyendo de esta forma a su conservación; aunque si bien de esta forma se favorece su permanencia, no permite realizar investigaciones encaminadas a desarrollar metodologías que permitan su propagación. A pesar

de que se cuenta con diferentes genotipos, estos son muy reducidos debido al escaso número de plantas madre, por ello, se propone al Cultivo de Tejidos Vegetales como una herramienta que permita su propagación a fin de obtener un gran número de plantas que permitan realizar estudios que lleven a la recuperación y reintroducción de esta especie.

Ubicación taxonómica (Takhtajan 1967)

REINO	Vegetal
DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Magnoliales
FAMILIA	Magnoliaceae
SUBFAMILIA	Magnoliadeae
GENERO	<i>Magnolia</i>
ESPECIE	<i>Magnolia grandiflora</i>

Nombre común: Piedra del corazón, Magnolia del Sur, Magnolia siempre-verde, gran laurel.

Descripción *Magnolia grandiflora* Linneus.

Arboles perenifolios, de 3 a 15 m de altura. Diámetro de 10-40 cm (d.a.p.); corona irregular; corteza externa parda verdusca, ligeramente fisurada; ramas tomentosas en los extremos de color negro, el resto de las hojas lenticelas de 0.5 a 1.5 cm de longitud con cicatrices circulares en cada nudo.

Hojas alternas, simples, de forma oval o lanceolada; coriáceas; de color verde claro brillante, de 7 a 21 cm de largo por 3 a 9 de ancho, glabras en el haz, densamente tomentosas ferrugíneas en el envés; Margen entero; ápice agudo o acuminado; base aguda o acuminada; nervación reticulada, con olor fragante cuando son estrujadas; peciolo de 1 a 3 cm de largo, tomentoso-ferrugíneo sólo en el ápice, el resto de color negro; estípulas libres, que encierran a las yemas y dejan cicatrices circulares en cada nudo, forma lanceolada y ápice agudo o

acuminado; de 1.5 a 3 cm de longitud, con indumento de tipo tomentoso-ferrugineo.

Flores bisexuales, actinomorfas, solitarias, terminales; pedúnculo de 3.6 a 4.3 cm de longitud, tomentoso-ferrugineo, cuando frescas las flores, presentan un aroma fragante (Figura 2b). Cáliz formado de tres piezas; sépalos oblongos u ovados, de ápice redondeado, base atenuada, cóncavos, de color blanco; de 14.5 a 17 cm de largo por 10 a 11 cm de ancho; glabros, carnosos, corola formada por 9 a 10 piezas en series de 3 y 4 los pétalos de la primera serie de forma obovada; de 15.5 a 17.5 cm de largo por 10.4 a 12.4 cm de ancho; los de la segunda serie de forma obovada, lanceolada y oblanceolada; de 13 a 16.5 cm de largo por 4.8 a 10 cm de ancho; los 7 con la base atenuada y ápice redondeado o agudo, cóncavos, de color blanco, glabros y carnosos. Estambres numerosos, hipogineos libres; arreglados en espiral sobre el androforo, de 2 a 3 cm de longitud; de forma laminar; amarillos; de 1.9 a 3.4 cm de longitud; el filamento y la antera muy poco diferenciados: anteras con dos tecas paralelas a lo largo, separadas en toda su longitud por tejido conectivo, con dehiscencia longitudinal, introrsas. Gineceo sésil de forma ovada, con numerosos pistilos espiralmente arreglados sobre un eje alargado; densamente tomentosos ferrugineos; ovarios uniloculares, uniloculares, separados, de 1 a 2 cm de longitud, con 2 óvulos, elípticos, anatropos, con placentación parietal; estilo recurvado en el ápice, de 7 a 12 mm de longitud; de color pardo oscuro; con el estigma sobre su cara interna. Fruto un multifolículo, de forma oval u oblonga de 10 a 12 cm de largo, tomentoso-ferrugineo; cada folículo, leñoso con dehiscencia dorsal, con una o dos semillas péndulas de un funículo corto.

Semillas de forma obovada, de 1.5 cm de largo por 7 mm de ancho, con una sarcotesta de color naranja (Figura 2c), abundante endospermo. Embrión recto y pequeño, cotiledones de forma obovada.

Whitaker (1933) reportó que *M. grandiflora* L. es hexaploide $2n = 114$.

Ecología de *M. grandiflora*.

Altitudinalmente se encuentra desde los 1000 hasta los 1800 m.s.n.m. Carolina septentrional, de donde es originaria esta especie, presenta un clima Cfa, templado-húmedo con lluvias todo el año y verano cálido, con una temperatura media del mes más caliente mayor de 22° C (Finch y Trewartha, 1954).

En el estado de Veracruz se localiza en zonas que quedan dentro del subtipo climático C (fm); templado-húmedo con lluvias todo el año, con una temperatura media del mes más caliente entre 6.5 y 22 °C (García, 1970).

Esta especie florece durante todo el año. Los frutos inmaduros se encuentran en el árbol desde el mes de julio hasta finales del año. Su polinización es de tipo entomófila, por coleópteros y por himenópteros, (Thien, 1974).

Generalidades de *M. grandiflora*.

Magnolia grandiflora es quizás una de las especies más hermosas de este género por la gran belleza de su flor de fragante aroma, de color blanco que llega a medir hasta 18 cm y sus hojas de color verde muy brillante (Figura 2a), esta planta es nativa del sureste de Estados Unidos, se distribuye desde el sur de Virginia, a lo largo de la costa del Atlántico, se encuentra más abundante en Louisiana, Mississippi y Texas (Thien, 1974, Little, 1979) y se extiende hasta el Caribe (Howard, 1948). No existe reportes de poblaciones naturales en México de *M. grandiflora* por lo que los individuos silvestres de esta especie se pueden deber a individuos que han escapado de los cultivos. En el estado de Veracruz se ve como planta cultivada en jardines como: en el Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero del Instituto de Ecología A.C; en el jardín central de Naolinco, a 800 m de Banderillas a Piletas. Carretera Perote-Jalapa; en el hospital que se encuentra en el cerro de Macuiltepec, Jalapa (Hernández-Cerda 1976) y en el área de colecciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, además en colecciones, jardines públicos y particulares. *M. grandiflora* está considerada como una especie amenazada por las leyes Mexicanas (Anónimo, 2002).



Figura 2 Los individuos de *M. grandiflora* son altamente apreciados como plantas de ornato y como plantas medicinales ya que en algunas regiones de México se le atribuyen propiedades antiespasmódicas y se usa para aliviar malestares estomacales. a) Ejemplar adulto de *M. grandiflora*; b) Las flores de esta especie son las más grandes de la familia Magnoliaceae; c) Las semillas maduras presentan sarcotesta de color naranja muy brillante.

En México *M. grandiflora* es una especie cuyo uso medicinal es amplio y antiguo, sobre todo en el centro del país como Michoacán, Puebla, Tlaxcala y Veracruz, donde se emplea principalmente para tratar padecimientos del corazón. El tratamiento recomendado es hervir la corteza con las flores e ingerir el cocimiento resultante como té, tres veces al día, en cambio, en otras regiones la utilizan como eficaz diurético, para ello hierven la corteza y flores para que la infusión sea tomada como "agua de uso" (Hernández-Cerda, 1976). Es de empleo muy antiguo, en el siglo XVI era usada para fortalecer el corazón y aliviar malestares estomacales. Más tarde las hojas se utilizaron como astringente y en cocimiento para curar la gota. Desde el siglo pasado, la infusión se usa como antiespasmódico (Hernández-Cerda 1976). Bastidas-Ramírez *et al.*, (1998) han encontrado que el compuesto activo aislado de *M. grandiflora* tiene un efecto antiespasmódico y anticonvulsivo en roedores y conejos, sugiriendo que puede ser usado en humanos. Clark *et al.*, (1981) confieren propiedades antimicrobianas al extracto de magnolol obtenido de esta planta, así mismo, esta especie es muy apreciada como planta de ornato en jardines y casas.

Conservación de los recursos vegetales.

La conservación no es un fin en sí, sino un medio para asegurar que los recursos genéticos vegetales y animales estén a disposición de las generaciones presentes y futuras (CIAT, 2001).

Food and Agriculture Organization (FAO), Secretaria de Marina y Recursos Naturales (SEMARNAT) reconocen que en la actualidad 1,2 millones de hectáreas son deforestadas al año y 600 mil más cambian de uso de suelo en el mismo periodo, a pesar de que la recomendación general es proteger los ecosistemas, a fin de conservar la flora y fauna silvestre. México a pesar de ser uno de los países con mayor diversidad, presenta un gran rezago en la implementación de medidas que permitan la conservación de sus recursos. Para la conservación de la diversidad biológica, y de forma más urgente para las especies amenazadas o en peligro de extinción, es necesario explorar todo tipo de estrategias de conservación observando que éstas no intervengan en los procesos naturales de la dinámica de los ecosistemas (Vázquez y Orozco, 1989).

Una vez identificados y caracterizados los recursos, los sistemas básicos en materia de conservación de la diversidad, son los métodos *in situ* y *ex situ*. Los primeros retienen a las plantas y animales en sus hábitats originales, mientras que la conservación *ex situ* mantiene a los organismos fuera de esos hábitats en centros como bancos de genes, cultivos de células, jardines botánicos o parques zoológicos entre otros. Estos dos sistemas no se excluyen mutuamente, distintos métodos de conservación pueden complementarse entre sí y servir de garantía contra las deficiencias de un método en particular.

Conservación *in situ*

La conservación de la biodiversidad en su hábitat natural, en áreas protegidas, reservas y/o parques naturales, es sin duda la mejor vía para su conservación, la FAO (2001) recomienda la conservación *in situ* como el método que debe emplearse para preservar los recursos fitogenéticos para la agricultura y de sus parentales silvestres, indica además que la principal ventaja de este enfoque es que permite que continúen los procesos evolutivos,

permitiendo así evaluar la adaptación de las especies vegetales y adaptar su composición genética a las condiciones cambiantes.

La controversia a esta idea para la conservación la constituye sin duda la destrucción de los ambientes naturales originada por la actividad humana, por ejemplo, para el caso de los bosques tropicales la extensión original de éstos se ha reducido en un 50% (Wilson, 1989). Para que la conservación *in situ* sea biológicamente pertinente, así como económica y socialmente viable, los científicos deben desarrollar un acervo de conocimientos que ayude a determinar qué se debe conservar, cómo conservarlo y dónde hacerlo (FAO, 2001). Es urgente establecer programas de desarrollo a través de análisis de ecología regional y sustentable, que necesariamente incluya a los habitantes de las regiones en la protección y explotación sustentable de los recursos bióticos bajo la supervisión de instituciones de investigación y gubernamentales, este mecanismo para la conservación de la diversidad biológica es sin lugar a dudas el modelo de más reciente creación y con mayores expectativas para la conservación *in situ* (CIAT, 2001).

Conservación *ex situ*

La conservación *in situ* es sin lugar a dudas la mejor opción para la conservación de la biodiversidad, sin embargo la creciente actividad humana la torna muy difícil de cumplir, por lo que es necesario implementar alternativas para la conservación *ex situ*.

Los programas para la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal son muy diversos y pueden variar su efectividad. Uno de los métodos más importantes lo constituyen los jardines botánicos, que han sido por muchos años grandes centros para la conservación, investigación científica y de educación de la riqueza florística (IUCN, 1987).

Los más de 1400 jardines botánicos registrados en el mundo representan una importante fuente de diversidad y en el futuro quizás sean la única ventana a la diversidad vegetal del mundo (Villalobos, 1988). Aunado a esto, en viveros estatales, delegacionales y particulares en México son propagadas algunas especies de interés ornamental a través de la propagación vegetativa como en el caso de *M. grandiflora*, la cual en últimas fechas ha sido empleada

crecientemente en parques y jardines del sector salud, como por ejemplo en el Centro Nacional de Rehabilitación en donde se cuenta con una población artificial de cerca de 120 individuos de aproximadamente 3 años.

Entre los métodos de conservación *ex situ* se encuentran los bancos de semillas y esporas. Este método sólo puede ser aplicable a especies con semillas quiescentes (ortodoxas), no así a especies con semillas recalcitrantes, este método es eficaz para conservar sin cambios las semillas y permite almacenar una gran cantidad de información genética por largos periodos en relativamente poco espacio, las semillas son refrigeradas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 4-7 %, el sistema debe recibir constante mantenimiento por lo que el proceso se vuelve costoso, en el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) se conservan de esta forma una gran cantidad de semillas de especies agrícolas como el maíz, sorgo y trigo: de igual forma se puede utilizar este sistema para especies forestales.

La criopreservación puede considerarse como otra alternativa para la conservación, se pueden almacenar células de potencial embriogenético; embriones, semillas, suspensiones celulares, tejidos meristemáticos, yemas, u órganos (Kartha, 1981, 1982 citado por Martínez-Palacios, 1998; Engelmann, 1991b; González-Arno *et al.*, 1997; Martínez y Revilla, 1999; Valbuena, 2000). El uso de las técnicas de criopreservación garantiza el almacenamiento seguro y a largo plazo, 50 años o más, del germoplasma vegetal (Valbuena, 2000). La criopreservación se basa en mantener las células y los tejidos a temperaturas ultrabajas, generalmente la del nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), la cual detiene todos los procesos metabólicos y la división celular (Engelmann, 1991b; González-Arno *et al.*, 1997). Entre los éxitos conseguidos, se han desarrollado protocolos de criopreservación de ápices caulinares y yemas procedentes de plantas cultivadas *in vitro* de *Centaurium rigualii*, *Antirrhinum microphyllum*, *Artemisia granatensis* (Chaudury, 1991); embriones maduros de *Cocos nucifera* L. (Assy-Bah y Engelmann, 1992); ápices de plántulas cultivadas *in vitro* de *Prunus dulcis* (Shatnawi *et al.*, 1999); yemas axilares de *Vitis vinifera* (Zhao *et al.*, 2001) y brotes apicales de kiwi (Wu *et al.*, 2001) por mencionar algunos ejemplos.

En los últimos años se han perfeccionado algunos protocolos nuevos de criopreservación por vitrificación, encapsulación-deshidratación y

deshidratación aplicables a una amplia variedad de especies, con los que se han obtenido índices elevados de sobrevivencia como en los casos de *Olea europaea* L. var. *Arbequina* (Martínez y Revilla, 1999); *Citrus deliciosa* (Aguilar et al, 1993; González-Arno, 1997); tubérculos y yemas de papa (Valbuena, 2000) y ejes embrionarios de *C. madurensis* (Eun et al, 2001) que son algunas especies conservadas a través de vitrificación; asimismo esta técnica es utilizada para la conservación de algunos frutos, sobre todo, cítricos y fresa.

La técnica de encapsulación-deshidratación es empleada en especies como *Saccharum* sp. que se conserva por medio de ápices de plántulas cultivadas *in vitro* (González-Arno et al., 1993); De igual forma ápices de plántulas *in vivo* de caña de azúcar (Paulet et al., 1993) son conservadas; Otros ejemplos son: ápices de tallo de manzana (Zhao et al., 1999); meristemos del paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* cultivados *in vitro* (Scocchi y Mroginski, 2000) así como yemas y tubérculos de papa (Valbuena, 2000).

En la actualidad, estos protocolos se están aplicando a especies de propagación vegetativa en el marco de experimentos a gran escala. El desarrollo de las técnicas de criopreservación ha avanzado con mayor lentitud en la esfera de la conservación a largo plazo de semillas recalcitrantes (Engelmann, 1991a; 1991b; Villalobos y Engelmann, 1995; Valbuena, 2000), así, la criopreservación exige desarrollar protocolos específicos para cada tipo de material o especie vegetal (Engelmann, 1991b).

Otro método para la conservación *ex situ* se puede considerar el establecimiento de parcelas o viveros los cuales retienen un germoplasma potencialmente explotable a nivel agrícola y hortícola de especies en donde se carece de semilla o especies con semillas recalcitrantes que únicamente son propagadas vegetativamente, como lo es el caso de muchas especies tropicales y subtropicales (Kookafkan, 1996), dentro de las cuales se encuentran las magnolias.

En instituciones como el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima, Perú y en la FAO se conservan regionalmente especies silvestres, así como variedades agrícolas mejoradas genéticamente para la alimentación y proyectos de desarrollo regional (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Williams, 1989, citados por Martínez-Palacios, 1998). Sistemas como este podrían ser

manejados a través de jardines botánicos para la conservación de las especies amenazadas y en peligro de extinción.

Otra alternativa para conservar la diversidad biológica vegetal *ex situ* es a través de las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) o cultivo *in vitro*, que es una aplicación de la tecnología diseñada para propagación de especies comestibles o de interés industrial y farmacológico y que en la actualidad está siendo aplicada para la conservación y propagación de especies nativas, amenazadas o en peligro de extinción. La utilización de esta técnica *in vitro* en programas de conservación podría llegar a evitar la pérdida de germoplasma y por lo tanto de la extinción total de algunas especies.

En condiciones ideales, los bancos de genes, bancos de semillas, laboratorios de biotecnología, etc. proporcionan almacenamiento a mediano-largo plazo pero no indefinido. Tanto las semillas como los tejidos se deterioran con el tiempo y hay que cultivar periódicamente las plantas con el objeto de generar semillas y tejidos recientes para un almacenamiento continuado. Por desgracia incluso los bancos de genes más sofisticados no pueden dar siempre una seguridad suficiente. Siguen malográndose grandes colecciones de plasma germinal debido a deficiencias técnicas y dificultades financieras o a desastres naturales. Las averías eléctricas, una documentación y evaluación insuficientes, los terremotos, las inundaciones, los desordenes sociales y políticos también pueden poner en riesgo bancos de genes (Martinez y Revilla, 1999; CIAT, 2001).

El mayor inconveniente de los bancos de genes *ex situ* consiste en que las plantas, una vez almacenadas, se sacan del proceso evolutivo que experimentan en la naturaleza. De ahí que, aunque los bancos de genes seguirán siendo de importancia vital para la conservación, los sistemas complementarios, incluidos los métodos *in situ*, asumirán probablemente una mayor importancia en el futuro (Martinez y Revilla, 1999; CIAT, 2001).

Cultivo de Tejidos Vegetales.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una rama de la Biología que basada en la totipotencialidad celular (Dodds y Roberts, 1982) ha establecido un conjunto de técnicas que hace posible dividir a un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro* protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones, y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, pH, luz, temperatura, atmósfera, etc.) (George y Sherrington, 1984; Chávez, 1993).

El éxito y trascendencia de este método ha permitido el establecimiento de nuevas y mejores alternativas de mejoramiento genético como la hibridación de protoplastos, cultivo de tejidos haploides (anteras y óvulos), generación de variabilidad genética, estudios de crecimiento y diferenciación, clonación con propósitos de una rápida multiplicación en especies de interés comercial y de difícil propagación, obtención de plantas libres de patógenos a través de cultivo de meristemas, estudios de reguladores de crecimiento, producción de metabolitos secundarios para uso industrial y medicinal, conservación de germoplasma, estudios básicos, etc. (George y Sherrington 1984; George, 1993).

La regeneración *in vitro* sólo es posible cuando se logra establecer explantes en condiciones asépticas e iniciar el cultivo *in vitro*, éstos se pueden ver influenciados por varios factores como son: el tipo de explante, el estado fisiológico de los explantes, la variabilidad genética de éstos, los reguladores del crecimiento y el tipo de medio de cultivo utilizados. (George, 1993).

Los componentes de los medios de cultivo están químicamente balanceados en sus sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas y aminoácidos, por lo que una correcta elección del medio puede ayudar a obtener respuestas favorables. Otros factores que se deben considerar son el pH, la luz y la temperatura de incubación. La manipulación de todos estos factores permite al investigador variar las condiciones de cultivo y llegar a dirigir la respuesta morfogénica y biosintética de las células (Dodds y Roberts, 1982; Gamborg, 1982; George, 1993).

Vías de regeneración *in vitro*.

La regeneración de plantas a través de CTV se puede alcanzar por medio de tres vías: 1) Elongación de brotes axilares, 2) Embriogénesis somática y 3) Organogénesis (George y Sherrington, 1984; Bonga y von Aderkas, 1992).

Elongación de brotes axilares.

Es la vía de propagación más utilizada en angiospermas leñosas y consiste en la elongación de las yemas que son liberadas de la dormancia inducida por la dominancia apical y se logra a través del estímulo con reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo, sobre todo de citocininas: ANA, AIA etc. (George y Sherrington, 1984). Esta vía de regeneración ofrece uniformidad y estabilidad genética de los cultivos deseados.

Embriogénesis somática.

Steward *et al.*, (1958); Reinert (1958) y Backs-Hüsemann y Reinert (1970) reportaron su éxito en la regeneración *in vitro* de zanahoria (*Daucus carota*), a través de embriones somáticos, los cuales eran estructuralmente iguales a los embriones cigóticos (Ammirato, 1987, citado por Chávez, 1993) desde entonces mediante esta técnica se ha logrado reproducir un gran número de especies. Aunque para muchas especies este proceso no está definido y en algunas especies leñosas el éxito ha sido limitado (Bajaj, 1986).

La formación de embriones somáticos a partir de células, tejidos y órganos puede llegar a presentarse tanto de forma directa, así como de forma indirecta, generalmente se logra por el cultivo del explante en presencia de alguna citocinina (BA, K, 2ip) en concentraciones altas (0.1-1 mg/l) y ocasionalmente por auxinas como: ANA y 2,4-D (Tisserat, 1985; George, 1993).

Embriogénesis somática directa.

En la embriogénesis directa el proceso de diferenciación de embriones somáticos se inicia a partir de un grupo de células directamente del tejido somático sin pasar por una fase amorfa del mismo denominada "callo" en este proceso se infiere que las células promotoras de los embriones están presentes ya en el tejido de la fuente de explante (Sharp *et al.*, 1980). Algunos explantes son capaces de desarrollar embriones somáticos porque están pre-embriogénicamente determinados, de acuerdo con George (1993) los genes regulantes de la embriogénesis algunas veces tienen cierta actividad remanente y son capaces de reactivarla nuevamente con el estímulo de los reguladores del crecimiento por lo que la respuesta morfogénica es directa del explante sin la necesidad de pasar por un callo como intermediario.

Embriogénesis somática indirecta.

Este proceso consiste en el establecimiento en cultivo *in vitro* de cualquier explante. la proliferación de callo y la subsecuente iniciación de estructuras proembrionarias en donde participa una célula o un grupo de éstas; prácticamente cualquier parte de la planta como raíz, hoja, tallo, embrión cigótico, cotiledón, hipocótilo, peciolo, etc. puede ser utilizado para inducir callo embriogénico (George y Sherrington, 1984; Tiserrat, 1985; George, 1993). Sin embargo, existe desacuerdo respecto a la embriogénesis somática indirecta, muchos autores (Williams y Maheswaran, 1986; Stacey *et al.*, 1990; Didits *et al.*, 1991; van Engelen *et al.*, 1991; Komamine *et al.*, 1992) ponen en duda el proceso de la embriogénesis somática indirecta ya que han registrado y documentado un proceso que puede explicar la formación de un "aparente" callo. En este proceso las células del explante originan directamente a nuevas células alargadas, las cuales se dividen y generan agregados laxos de células pequeñas con denso citoplasma (microcallo), las cuales a su vez se dividen y originan más células alargadas que radian en todas direcciones y que después se dividen terminalmente produciendo agregados de células pequeñas. Estas divisiones desiguales se presentan después de que el núcleo y la mayor parte del citoplasma migraron hacia el extremo distal de la célula alargada, entonces el núcleo se divide y se forma una pared celular, produciéndose una célula pequeña con denso citoplasma en el extremo distal de una célula larga.

Esta alternancia de células largas y cortas se repite varias veces resultando una red de agregados interconectados de células largas y cortas que se observan como un callo laxo blanquecino; eventualmente los agregados se dividen y forman un haz laxo de células largas (en una sola dirección) semejante a un suspensor. Las células meristemáticas continúan dividiéndose y constituyen una masa de células embrionales las cuales darán origen a los embriones somáticos; a éste proceso lo han denominado Masa de Proembriones y Suspensores (PEMS por sus siglas en inglés); y es muy parecido al desarrollo del embrión en gimnospermas descrito por Attree y Fowke (1991).

Organogénesis.

La organogénesis es la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemas y con ello de la producción mundial de plantas *in vitro* (Vasil, 1994 citado por Martínez-Palacios, 1998). Involucra la diferenciación de brotes y raíces en diferentes tiempos para desarrollar una planta completa. Los brotes regenerados pueden ser obtenidos en medios con altas concentraciones de citocininas y posteriormente individualizados y enraizados en diferentes medios comúnmente con la adición de auxinas y de esta forma obtener una planta completa (Ahuja, 1993; Mata, 2000).

Los procesos organogénicos se pueden dividir en: organogénesis directa y organogénesis indirecta (George y Sherrington, 1984; Tisserat, 1985; George, 1993).

Organogénesis directa

En la organogénesis directa (O.D.) el surgimiento de los brotes adventicios se logra directamente del explante sin pasar por la fase de callo, se pueden utilizar como explantes embriones, hojas, bulbos, tallos, rizomas y tubérculos, al contrario de la embriogénesis somática directa los promotores de la organogénesis directa son altas concentraciones de citocininas y bajas o nulas de auxinas (George, 1993).

Organogénesis indirecta.

De igual forma que en la embriogénesis indirecta los brotes regenerados se forman con la mediación de callo y son el resultado de la interacción del medio de cultivo, reguladores del crecimiento, del genotipo del explante así como de su estado fisiológico y edad del mismo (George, 1993); al igual que en la embriogénesis somática indirecta los promotores de la callogénesis son altas concentraciones de auxinas y bajas o nulas de citocininas (George, 1993). Los brotes regenerados vía O.I. se logran después de que en el callo las células han sido redeterminadas en las nuevas divisiones celulares que les ocurren y así adquieren competencia (capacidad) organogénica, las células forman una estructura unipolar que puede ser un nuevo brote o bien una raíz (Sharp *et al.*, 1980).

Estos procesos morfogenéticos han sido estudiados desde el siglo pasado en la década de los 40's y a través de los años subsecuentes se han hecho aportaciones substanciales para comprenderlos y optimizarlos en un gran número de especies de hortalizas de interés comercial, sin embargo en plantas perennes o leñosas ésto ha sido más complicado (Bajaj, 1992).

Cultivo de Tejidos Vegetales en Angiospermas (árboles).

Las especies forestales cubren 29-34% del área de la Tierra, de éstas el 60% son gimnospermas y alrededor del 38% son angiospermas (Thorpe *et al.*, 1991). En los últimos 15 años se han logrado progresos considerables en el desarrollo de métodos de propagación convencional vegetativa de forma masiva de especies arborescentes al manipular las condiciones de humedad, así como las concentraciones de giberelinas y otras sustancias a fin de obtener un mayor número de plantas. Los esfuerzos se han dirigido principalmente a especies de gimnospermas de interés maderable para las cuales se han desarrollado métodos en enraizamiento de esquejes o fasciculos, injertos e incluso cruza de árboles élite para la producción de semillas de alta calidad en algunas especies de coníferas (Bonga y von Aderkas, 1992). Sin embargo esto no es aplicable en todas pues aún faltan muchas especies por ser estudiadas (Thorpe y Harry, 1991). Los métodos biotecnológicos como el CTV en gimnospermas de interés forestal y comercial han sido ampliamente documentados y se han desarrollado protocolos de micropropagación para algunas especies como: *Taxus* y *Pseudotsuga menziesii* (Sommer *et al.*, 1975; Sommer, 1975; Brown y Sommer, 1977; Sommer y Brown, 1997; citados por Mata-Rosas 2000); *Pinus strobus* (Feinert *et al.*, 1989); *Picea abies*, *P. glauca*, *P. taeda*, *Abies alba*, *Larix decidua* (Schuller *et al.*, 1989; citado por Mata-Rosas 2000); *P. mariana* y *P. rubens* (Tremblay y Tremblay, 1991).

En el caso de las angiospermas la propagación convencional, así como los métodos biotecnológicos, se han orientado principalmente a las especies de interés comercial, por ejemplo en especies frutales (*Citrus*, *Musa*, etc.) en las cuales se han desarrollado protocolos de propagación altamente detallados (Reinert y Bajaj, 1977; Bonga, 1977; Winton, 1978; Karnosky, 1981; Farnum *et al.*, 1983 citados por Bajaj, 1986), con el fin de obtener un gran número de plantas que cubran los requerimientos alimenticios cada vez más demandantes (CIAT, 2001). En el caso de las especies ornamentales el número de especies propagadas por CTV es menor (Callaway, 1996) y cuando se trata de angiospermas forestales, amenazadas o en peligro de extinción el número de trabajos es aún más reducido (Bajaj, 1986) y es casi nulo al hablar de especies mexicanas y en peligro de extinción.

Los pioneros en cultivo de tejidos de especies leñosas se remontan al siglo pasado en la década de los años 30 (Ahuja, 1993) y se realizaron principalmente en gimnospermas, más tarde y en menor número, las angiospermas arborescentes fueron estudiadas. Entre los primeros trabajos reportados se encuentran los realizados por LaRue en 1948 con megagametofitos de *Zamia floridiana* (= *Z. pumila*) y *Z. pumila* en 1954; Ball en 1950 logró la proliferación de callo en *Sequoia sempervirens*; dentro de los primeros trabajos se encuentran también los realizados por Norstog (1965); Norstog y Rhamstine (1967) al lograr embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de *Z. pumila*; En 1965 Rao reportó embriogénesis somática en *Santalum album*; más tarde en 1985 Gautheret (citado por Thorpe *et al.*, 1991) reportó la regeneración de brotes en *Ulmus campestris*; Reynolds y Murashige (citados por Litz y Jaiswal, 1991) en 1979 reportaron la embriogénesis somática a partir de yemas apicales en *Phoenix dactilifera*; Tisserat (1987) sólo pudo lograr la elongación *in vitro* de yemas adventicias de *Phoenix dactilifera*. En 1988 Tisserat y De Mason obtuvieron callo embriogénico y nuevas yemas adventicias de esta misma especie; McGranahan *et al.* (1987) establecieron parcialmente cultivos *in vitro* de *Juglans sp*; más tarde en 1992 Leslie y McGranahan lograron la proliferación de brotes adventicios a partir de secciones de nudos de *Juglans regia*.

McCown y McCown (1987) lograron establecer cultivos de *Carya*, *Fagus* y *Quercus*, sin embargo reportaron que el establecimiento de dichos cultivos fue difícil. Chalupa consideró que la dificultad en el cultivo de árboles se debe a que éstos crecen muy lento de forma natural en su hábitat, por lo que se puede esperar que sea difícil su micropropagación; en tiempos más recientes se ha incrementado el número de especies de angiospermas arborescentes regeneradas a través de CTV (Tabla 1), en general las especies leñosas presentan dificultad para su establecimiento *in vitro* por lo que se recomienda utilizar medios de cultivo con bajas concentraciones de sales minerales como el medio MS modificado o el medio WP en combinación con citocininas y auxinas (Chalupa, 1987). Las angiospermas han sido micropropagadas utilizando meristemos, yemas, nudos, embriones cigóticos, hojas y polen (Chalupa, 1987).

Tabla 1 Algunas especies de angiospermas arborescentes que han sido regeneradas o propagadas *in vitro*.

Especie	Fuente de explante	Respuesta obtenida	Referencia
<i>Actinidia</i>	Lf	C	Predieri <i>et al.</i> , (1988)
<i>Alnus crispa</i>	Stp. adv. Bud	D	Read <i>et al.</i> (1982)
<i>Alnus glutinosa</i>	Stp	D	Garton <i>et al.</i> (1981)
<i>Alnus sp.</i>	Stp. Bud, Hyp	A, B	Dustan y Thorpe (1986)*
<i>Azadirachta indica</i>	Emb, Stm	C	Sanyal y Datta (1986)*
<i>Carya papaya</i>	Ap. Bud, adv. Bud, Emb, Ndc.	D, E	Litz, 1986 ; Dewinnaar, 1988 ; Drew, 1988 ; Reuveni <i>et al.</i> , 1990 ; Drew <i>et al.</i> , 1991 y Ficht y Manshardt, 1990 ; Ficht, 1991, 1993
<i>Citrus sinensis</i>	Art, Emb, End, Ovl.	E	Hidaka, (1984) ; Kobayashi <i>et al.</i> , (1984) ; Hidaka y Kajiura, (1988) y Gmitter <i>et al.</i> , (1990)
<i>Citrus reticulata</i>	Emb, Ovl.	E	Vardi y Spiegel-Roy, (1982); Hidaka y Kajiura, (1988)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Ap. Bud	D, E	Mascarenhas <i>et al.</i> (1982); McComb, (1995)
<i>E. tereticornis</i>	Ap. Bud	A, E	Mascarenhas <i>et al.</i> (1982); McComb, (1995)
<i>E. marginata</i>	Ap. Bud	E	McComb, (1995)
<i>Ficus spp.</i>	Stp, Lf	A, C	Dustan y Thorpe (1986)*
<i>Hammamelis virginiana</i>	Emb.	E	Zilis y Meyer (1977)*
<i>Malus domestica</i>			
<i>Mangifera indica</i>	Bud, Stp,	D	Lane, (1992)
<i>Musa spp.</i>	N	E	Litz <i>et al.</i> , (1982)
	Lf, R	E	Novak <i>et al.</i> , (1988)
<i>Microcitrus spp.</i>	Emb, Ovl, Prt	E	Vardi <i>et al.</i> (1986)*
<i>Paulownia spp.</i>	Stm, Bud, Stp, Emb, Hyp, Cot, Pet, Lf, Ant, Ovl.	A, B, C, E	Dustan y Thorpe (1986)*
<i>Populus spp</i> e híbridos	Stp, Bud, Stm, Ant, Cam, Lf, Prt, Stp, Hyp	A, B, C, D	Dustan y Thorpe (1986)*; Lubrano, (1992)
<i>Prosopis spp</i>	Stp, Hyp	A, B	Tabone <i>et al.</i> (1986)*; Goyal y Arya (1981)
<i>Quercus spp.</i>	Adv. Bud	A, C, E	Dustan y Thorpe (1986)*; Srivastava y Steinhauer (1982)
<i>Rhododendron spp.</i>	Stp, Bud, Fl	A, B	Dustan y Thorpe (1986)*
<i>Santalum album</i>	Endosperm, Hyp	D, E	Lakshmi Sita <i>et al.</i> (1980) ; Rao y Bapat, (1992)
<i>Santalum spp.</i>	Ndc, Stm, Stp, Emb, Cot, Hyp, End	A, B, C, E	Dustan y Thorpe (1986)*
<i>Ulmus spp.</i>	Hyp, Stm, Bub, Prt	A, C	Dustan y Thorpe (1986)*

Abreviaciones utilizadas: Fuente de explante: Adv. Bud = Yema adventicia; Ap. Bud o Bud = yema apical o terminal; Ant = antera; Cot = cotiledones; Emb = embrión cigótico; End = endospermo; Fl = flores y partes florales; Hyp = hipocótilo; Lf = hoja; Ovl = óvulo; Prt = protoplasto; N = Nucela; Ndc = Secciones de nudo; R = Rizoma Stm Secciones de tallo; Stp = ápice de tallo. Respuesta obtenida: A = Formación de yemas; B = Brotes via Organogénesis directa; C = Brotes via organogénesis indirecta; D = Brotes adventicios; E = Embriogénesis somática.

* tomados de George y Sherrington (1984); tomados de Bajaj (1992); tomados de Bajaj (1995)

Propagación convencional de magnolias

De manera general las especies de la familia magnoliaceae pueden ser propagadas a través de dos vías: 1) reproducción sexual, en la que interviene la fusión de gametos para la formación de semillas y 2) reproducción asexual, que involucra el uso de estructuras vegetativas de la planta como raíz, tallo o brotes.

Propagación por semilla.

La propagación a través de esta vía, se logra sólo después de que el embrión rompe el periodo de latencia, la semilla germina una vez que se ha degradado la sarcotesta o exocarpio (testa carnosa) y el agua ha logrado permear la esclerotesta (testa dura). En la naturaleza las semillas germinan cuando las semillas se dispersan del fruto y caen enterrándose en el suelo o bien cuando éstas son ingeridas por pequeños mamíferos o aves que las escarifican en su tracto permitiendo con ello la germinación cuando las semillas son expulsadas con las excretas (Callaway, 1996).

De acuerdo con Callaway (1996) para inducir la germinación de Magnolias las semillas deben ser refrigeradas por un periodo de 2 a 4 meses a temperaturas de 0.5 a 4.4 °C en bolsas de papel o en bolsas de plástico que contengan una mezcla 3 a 1 de Sphagnum y semillas. Una vez transcurrido este periodo se rompe la latencia de la semilla, se reduce la producción de fenoles y se logra la germinación. Las semillas deben ser sembradas en primavera en un sustrato bien drenado y deben mantenerse de 18 a 24 °C. Sin embargo este método no es válido para todas las especies; Vovides e Iglesias (1996) encontraron en su análisis sobre la germinación de semillas de *M. dealbata* que el periodo de almacenamiento en refrigeración no influyó de manera significativa en los porcentajes de germinación obtenidos.

Propagación vegetativa.

Algunas especies de la familia Magnoliaceae son propagadas vegetativamente para su comercialización en los Estados Unidos y en países de Asia, en donde se distribuyen especies de esta familia tales como: *Magnolia acuminata*, *M. campbelli*, *M. dawsoniana*, *M. denudata*, *M. grandiflora*, *M. kobus*, *M. lilliflora*, *M. sargentiana*, *M. stellata*, *M. x soulangiana*.

Esta vía de propagación es empleada debido a la uniformidad genética y fenológica de las plantas obtenidas; y a la reducción de tiempo de maduración y floración (Callaway, 1996). Dentro de los métodos vegetativos de propagación usados en las magnolias están:

- a) Enraizamiento de estacas
- b) Acodos
- c) Injertos

A través de éstos métodos se han logrado avances en el campo de la horticultura y jardinería: Durr y Heusen (1987) determinaron concentraciones de 0.3 a 1.0 % de IBA y ANA para enraizamiento de estacas en *M. grandiflora*; Ellis (1988) documentó la propagación de varias especies de magnolias a través de éstos métodos. En 1995 Johnstone reportó el éxito en la propagación vegetativa utilizando el método de estacas para *M. sargentiana* var. *Robusta* y *M. dawsoniana*, comparándolo además con el método de injerto y evidenciando las ventajas de las estacas sobre los injertos y acodos. Sin embargo la propagación vegetativa a través de estos métodos presenta una serie de desventajas como son:

- 1) El número limitado de plantas obtenidas por cualquiera de estas vías.
- 2) La necesidad de mantener un lote muy grande de plantas madre en buenas condiciones (libres de patógenos).
- 3) Rotación continua de plantas madre (las plantas de menor edad producen un mayor número de brotes que las plantas de mayor edad).
- 4) Requieren gran extensión de espacio y mucho tiempo de manipulación.

Cultivo de Tejidos en la familia Magnoliaceae.

No existen muchos trabajos referentes a la micropropagación de especies en la familia magnoliaceae. Le page-Degivry (1970) reportó la germinación *in vitro* de *M. grandiflora* y *M. soulangiana*. Furmanowa y Rzedowski (1977) iniciaron cultivos de callo a partir de tallos y brotes apicales de árboles de 1 a 3 años de edad de *Liriodendron tulipifera*. Rzedowski (1981) reportó la formación de plantas de *M. grandiflora*, pero no fueron capaces de sobrevivir en condiciones de invernadero. Biedermann (1987) intentó la micropropagación de un grupo de híbridos de magnolia a partir de yemas adventicias de árboles maduros pero sólo obtuvo proliferación de callo. Stefaniak y Wozny (1983) cultivaron fragmentos de internodos, peciolo y lamina de hoja de *L. tulipifera* obteniendo sólo callo no morfogenético. Merkle y Sommer (1987) reportaron la regeneración de *L. tulipifera* a partir de cultivo de protoplastos y en 1990 la maduración y establecimiento de embriones somáticos. Así mismo Merkle y Wiecko (1990) lograron el cultivo de *M. virginiana*, *M. fraseri* y *M. acuminata* usando embriones inmaduros. Tobe (1990) cultivó yemas apicales de *M. grandiflora* sin lograr su desarrollo e igualmente no obtuvo plantas.

Dentro del mismo género existen algunas especies que han sido más difíciles de cultivar que otras, esto puede atribuirse a la alta oxidación que presentan, derivada sin duda de la alta concentración de compuestos fenólicos que contienen las magnolias, especialmente aquellas que presentan flores de color y de manera especial las de color amarillo. De acuerdo con McCown (citado por Callaway, 1996) las magnolias cultivadas *in vitro* presentan una tendencia a la hiperhidratación, los brotes aparecen cristalinos e hiperhidratados, la mayoría se revierten a callo y no enraizan (Callaway, 1996). Biedermann (1987) reportó que el contenido de fenoles es más bajo en las magnolias después de romper la dormancia, esto es, de Diciembre a Marzo y sugiere reducir la concentración de carbohidratos y NO_3 para obtener mejores resultados.

McCulloch (citado por Callaway 1996) sugiere ajustar las sales y los reguladores de crecimiento para cada una de las especies, pues reporta que no todas las magnolias se pueden micropropagar en el medio Woody Plant (WP) (Callaway, 1996). Por el contrario Tobe (1990) reportó resultados exitosos de

M. grandiflora cultivadas en medio WP enriquecido con 6-bencilaminopurina (BAP).

De acuerdo con McCulloch y McCown presidentes de Brigas Nursery Inc. y Knight Hollow Nursery Inc; una vez que se logra la regeneración *in vitro* de una especie de la familia magnoliaceae, el establecimiento en invernadero o vivero es un factor que limita el número de plantas comercializables (Callaway, 1996). Maene y Debergh (1985a, 1985b) después de varios ensayos para el establecimiento de plántulas regeneradas en condiciones de invernadero concluyen que es necesario que las plántulas adquieran una talla mínima de 4 cm para obtener una mayor probabilidad de sobrevivencia ya que plántulas más pequeñas (menores de 4 cm) no logran superar esta etapa de endurecimiento, así mismo recomiendan el empleo de sustrato compuesto por la combinación de musgo y perlita; musgo y vermiculita; o bien musgo y poliuretano en porciones de 3:1 para establecer las plántulas en invernadero, además de aplicar algún fungicida.

Solamente las empresas comerciales Brigas Nursery Inc. y Knight Hollow Nursery Inc. en Estados Unidos mantienen cultivos exitosos *in vitro* de *Magnolia acuminata* var. *subcordata*, *M. kubus* var. *Loebneri*, *M. grandiflora* y *M. kubus* var. *stellata* para su comercialización; sin embargo sus técnicas de propagación son manejadas como secreto industrial.

Importancia de los procesos oxidativos en el cultivo *in vitro* y alternativas para contrarrestarlos.

Un problema severo que se presenta en algunas especies sobre todo aquellas de regiones tropicales o subtropicales en cultivo *in vitro*, es la muerte por oxidación de los tejidos. Cuando un tejido es seccionado, los bordes o sitios de corte se tornan café-negro y se pueden oxidar en pocos minutos u horas ocasionado por la presencia de fenoles y quinonas tóxicas (Mónaco *et al.* 1977). La presencia de estos compuestos en las células dañadas es la causa directa de la reacción oxidativa, la cual está condicionada a una serie de factores como pueden ser: la edad fisiológica del explante (tejidos jóvenes contienen menores cantidades de compuestos fenólicos) y por el contenido natural de ellas, el cual es elevado en ciertas especies como en palmas, algunos frutales y especies ornamentales como en el caso de las magnolias. En ciertos casos la temporada del año puede ser incluso la causa que promueva la oxidación (Vargas, 1988).

Cuando un tejido es seccionado para su siembra *in vitro* se facilita la reacción entre las enzimas oxidativas tales como la polifenoloxidasas, las peroxidasas y las tirosinasas y sus sustratos, por ejemplo, la tirosina o hidroxifenoles como el ácido cloragénico que se encuentran en diferentes compartimentos de la célula, la cual al ser seccionada libera su contenido, poniendo en contacto estas sustancias y provocando la oxidación (George y Sherrington, 1984). La toxicidad de los fenoles se debe probablemente a que se enlazan con las proteínas a las cuales en caso extremo pueden llegar a polimerizar y oxidar para formar compuestos melánicos (George y Sherrington, 1984). Generalmente la oxidación trae como consecuencia el crecimiento reducido y la muerte eventual de los tejidos cultivados (Bonga y von Aderkas, 1992).

El problema de la oxidación de los tejidos ha sido tratado por varios métodos para tratar de extraer del medio los compuestos fenólicos producidos por los cortes en los explantes, entre estos métodos se encuentran:

a) Baños a los explantes en una solución de antioxidantes antes de cultivarlos y/o adicionarlos al medio de cultivo

Se han intentado pretratamientos con agua corriente en semillas para lavar los compuestos fenólicos o bien lavar los explantes (Vargas, 1988). Utilizando cultivos de células en suspensión de tabaco BarNun y Mayer (1983) lograron suprimir la actividad de la catecoloxidasa con Norleucina en un 70% por 5 días sin afectar su crecimiento, por lo que se ha sugerido para controlar la oxidación *in vitro*.

Los antioxidantes comúnmente utilizados son el ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína y Norleucina que pueden ser utilizados en enjuagues, lavando los explantes antes de ser sembrados en el medio de cultivo o bien ser adicionados al mismo, además de aquellos compuestos con alta afinidad con sustancias fenólicas como la polivinyl-pirrolidona y pirogalol (Bhojwan, 1993; Endress, 1994).

El ácido ascórbico es una lactona de azúcar-ácido. Es un potente reductor que cede con facilidad los átomos de hidrógeno para transformarse en ácido deshidroascórbico y es un compuesto sensible a la temperatura; mientras que el ácido cítrico es un ácido carboxílico ampliamente distribuido en tejidos animales y vegetales cuyos grupos polares ácidos e hidroxilo le permiten tener propiedades antioxidantes, además de ser un agente que atrapa trazas de metales. La cisteína es un aminoácido que contiene un grupo sulfidrilo, el cual es muy reactivo y extremadamente susceptible a la oxidación a disulfuro por el oxígeno atmosférico en presencia de sales de hierro u otro oxidante suave (Uribe, 1998).

b) Añadir carbón activado al medio de cultivo

Una práctica muy común es la adsorción con carbón activado, el cual captura las sustancias tóxicas que son liberadas en el medio por los explantes, sin embargo los reguladores de crecimiento pueden ser también adsorbidos y en consecuencia el medio con carbón activado debe ser cambiado con frecuencia (George y Sherrington, 1984).

c) Realizar subcultivos frecuentes para evitar la oxidación

Una de las acciones más utilizadas para intentar contrarrestar la oxidación de los tejidos son los subcultivos frecuentes. Las transferencias de medio de cultivo a intervalos frecuentes de tiempo evitan la acumulación de las sustancias tóxicas, además las partes necrosadas del tejido pueden removerse antes de que afecten al tejido sano (Bonga y von Aderkas, 1992).

d) Incubar los explantes en sus etapas iniciales con luz reducida

La exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas oxidativas y por tanto la biosíntesis de los compuestos fenólicos responsables de la muerte de los tejidos. Para reducir o prevenir la oxidación, los cultivos se pueden mantener en oscuridad por 14 días o más antes de ser transferidos a baja intensidad luminosa (George y Sherrington, 1984).

En algunos casos se necesita la conjunción de dos o más de estos métodos para detener la oxidación y en los casos más severos es muy difícil prevenirla o evitarla

JUSTIFICACIÓN.

La propagación de *M. grandiflora* y *M. dealbata* a través de los métodos convencionales ha resultado difícil y con baja eficiencia. Ambas especies se encuentran dentro de un estatus de protección por las leyes mexicanas, por lo que es necesario encaminar esfuerzos para su estudio, conservación y propagación. El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una excelente herramienta con los alcances necesarios para incrementar el número de individuos, con los cuales se podrían realizar estudios ecológicos, genéticos y fisiológicos que lleven a una posible reintroducción y restablecimiento de las poblaciones naturales, así como para la propagación comercial de estas especies. Por lo que el presente trabajo tiene como fin explorar el potencial regenerativo *in vitro* y establecer un protocolo eficiente de propagación que contribuya a la conservación de éstas especies de la flora mexicana.

OBJETIVOS.

GENERALES

Inducir respuestas morfogénicas (callo, raíces, hojas, brotes, embriones somáticos) *in vitro* de *Magnolia dealbata* y *M. grandiflora*.

Establecer protocolos para la regeneración de ambas especies.

PARTICULARES

Explorar el potencial morfogénico de tejidos somáticos (yemas apicales, laterales, hojas) y embrionarios (embriones cigóticos) de plantas adultas.

Establecer la combinación de reguladores del crecimiento que favorezcan la regeneración vía embriogénesis somática.

Determinar los requerimientos físicos (condiciones de incubación) y químicos (medio de cultivo y reguladores del crecimiento) óptimos para obtener la mayor cantidad de plántulas regeneradas de éstas especies a través de CTV.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El material biológico utilizado fue: yemas apicales y laterales, así como, hojas inmaduras y embriones cigóticos maduros de *Magnolia grandiflora* y *M. dealbata*. El material biológico de la primera especie fue colectado de árboles adultos del área de colecciones del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero del Instituto de Ecología A.C. y del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El material biológico de la segunda especie se colectó de plántulas germinadas en el Jardín Botánico Clavijero y las semillas maduras provenían de los frutos colectados en la población natural ubicada en Coyopola, municipio de Ixhuacán de los Reyes, Ver. (Figura 2).

Los medios empleados para la siembra de los diferentes explantes fueron el utilizado por Merkle y Sommer (1991) al que se le denominará de aquí en adelante medio MM, así como, el medio Woody Plant, WP (Lloyd y McCown, 1981). Se emplearon diferentes combinaciones y concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (K) en combinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenácético (ANA) respectivamente (tablas 2 – 4).

A todos los medio de cultivo se les ajustó el pH a 5.5 con NaOH y/o HCl 1N previo a la adición de agar-agar 5.5 g l⁻¹ o phytigel 2.7 g l⁻¹. Se vertieron 25 ml de medio en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad y fueron esterilizados en autoclave a 120°C y a una presión de 15 lb psi⁻¹, durante 17 min.

Cultivo de embriones cigóticos maduros de *M. grandiflora* y *M. dealbata*

Magnolia grandiflora.

Se colectaron frutos maduros de *M. grandiflora* de una a dos semanas antes de su dispersión, se extrajeron las semillas y fueron desinfectadas superficialmente de la siguiente manera:

DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

- 1) Se lavaron en una solución de detergente comercial en agitación continua por 30 min.
- 2) Se enjuagaron con agua destilada por 10 min.
- 3) Se desinfectaron superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial 30% v/v (6% de cloro activo) adicionado con Tween 80, 3 gotas por cada 100 ml. de solución y en agitación constante durante 15 min.
- 4) Mecánicamente se retiró la sarcotesta
- 5) A las semillas sin sarcotesta se les realizó una segunda desinfección en una solución de hipoclorito de sodio comercial 15% v/v (6% de cloro activo) adicionado con Tween 80, 3 gotas por cada 100 ml. de solución y en agitación constante durante 20 min.
- 6) Bajo condiciones asépticas se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada.
- 7) Con la ayuda de instrumental y microscopio de disección, se realizó la extracción y siembra de embriones cigóticos bajo condiciones asépticas.

Germinación de embriones de *M. grandiflora* en medio MM.

Para determinar la concentración óptima de L-Norleucina que podría inhibir los procesos oxidativos de los embriones, se ensayaron diferentes concentraciones de este compuesto (1 y 5 μM), para lo cual se colocaron 20 embriones en los diferentes tratamientos durante 2 h, así como un lote control que se colocó en agua destilada.

Previo a la siembra de los embriones, se les aplicó un baño con una solución de L-Norleucina (1 μM) durante 2 horas, posteriormente se les aplicó un segundo baño en una solución de agentes antioxidantes (ácido ascórbico 250 mg/l, ácido cítrico 250 mg/l y L-Cisteína 100 mg/l) por 20 min. La solución previamente fue esterilizada por filtración a través de un filtro millipore (0.45 μm).

Los embriones fueron sembrados en el medio MM adicionado de los reguladores de crecimiento BAP/2,4-D en 4 combinaciones (0/0, 0.25/2, 1/2, 1/1, 2/1) sembrando 3 embriones por frasco con 4 repeticiones para cada tratamiento.

Cultivo de embriones cigóticos de *M. dealbata*

Los frutos colectados se colocaron en una caja de madera y se dejaron por 3 a 7 días a temperatura ambiente para que abrieran y se pudieran extraer las semillas, el proceso de desinfección fue el siguiente:

DESINFECCION DE SEMILLAS.

- 1) Se enjuagaron bajo el chorro de agua corriente con el fin de eliminar las partículas de polvo y tierra que se le adhirieron
- 2) Se lavaron en una solución de detergente comercial en agitación continua por 20 min.
- 3) Se enjuagaron con agua destilada por 10 min.
- 4) Se desinfectaron por 2 minutos con etanol al 70%
- 5) Se desinfectaron superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial 30% v/v (cloralex 6% de cloro activo) adicionado con Tween 80, 3 gotas por cada 100 ml solución y en agitación constante durante 15 min.
- 6) Se retiró la sarcotesta de las semillas y se repitió el proceso de desinfección superficial antes mencionado únicamente cambiando la concentración de cloro a 20%.
- 7) Bajo condiciones asépticas se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada.
- 8) En la campana de flujo laminar y con la ayuda de instrumental y microscopio de disección, se realizó la extracción y siembra de embriones cigóticos maduros.

Los embriones fueron sembrados en los medios MM y WP adicionados de las diferentes combinaciones de BAP y 2,4-D (Tabla 2).

Tabla 2 Combinaciones de reguladores del crecimiento BAP/2,4-D adicionados al medio MM y WP ensayados para el cultivo de embriones cigóticos de *M. dealbata*.

BAP mg/l	2, 4 - D mg/l			
	0	0.1	0.5	1.0
0	1	2	3	4
1	5	6	7	8
3	9	10	11	12
5	13	14	15	16

Cultivo de yemas apicales, yemas laterales y hojas de *M. dealbata* y *M. grandiflora*.

Se cortaron ramas terminales de árboles de *M. dealbata* y *M. grandiflora* de aproximadamente 5 cm de largo, con el fin de obtener yemas apicales y laterales. Las hojas de mayor tamaño se retiraron para facilitar la disección de las ramas, las cuales fueron desinfectadas de la siguiente manera:

DESINFECCION

- 1) Las ramas se lavaron en una solución de detergente comercial en agitación constante por 30 min.
- 2) Se enjuagaron con agua destilada
- 3) Se desinfectaron superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial 30% v/v (1.2% de cloro activo) adicionado con Tween 80, 3 gotas por cada 100 ml de solución y en agitación constante durante 30 min.
- 4) Bajo condiciones asépticas (en la campana de flujo laminar) se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada.
- 5) Finalmente con la ayuda de instrumental y microscopio de disección se disectaron las yemas ápicales y laterales, así como el segundo a cuarto par de hojas de aproximadamente 0.7 a 1.2 cm de longitud (inmaduras y sin expanderse).

Cultivo de yemas apicales y yemas laterales de *M. dealbata* y *M. grandiflora*.

Los segmentos de ramas de ambas especies se disectaron separando hojas, yemas apicales y laterales. Las yemas, tanto apicales como laterales, median de 0.3 a 0.7 cm. y se sembraron en medio WP adicionado con diferentes concentraciones de BA/ANA (Tabla 3), se sembraron 6 yemas apicales y 6 yemas laterales para cada tratamiento utilizando el medio WP con los reguladores del crecimiento BAP/ANA en diferentes concentraciones en todas sus combinaciones (Tabla 3) utilizando el medio Woody Plant en ambas especies. En otro ensayo, sólo para *M. grandiflora*, se sembraron yemas apicales y laterales empleando únicamente el medio MM suplementado con diferentes concentraciones de BA/ANA y K/2,4-D (Tabla 4)

Tabla 3 Combinaciones de reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo de yemas apicales, yemas laterales y hojas de *M. dealbata* y *M. grandiflora* en el medio de cultivo WP.

Tratamiento BAP mg/l	ANA mg/l				
	0	0.25	0.5	1.0	3.0
0	1	2	3	4	5
1.0	6	7	8	9	10
2.0	11	12	13	14	15
3.0	16	17	18	19	20
5.0	21	22	23	24	25

Hojas de *M. dealbata* y *M. grandiflora*

En una primera etapa se sembraron hojas completas de 0.3 a 0.7 cm de *M. dealbata* y *M. grandiflora* en medio WP, 3 hojas en cada contenedor con 4 repeticiones para cada tratamiento (Tabla 3) . así como hojas de *M. grandiflora* en medio MM suplementado con BAP/ANA y K/2,4 – D (Tabla 4).

Tabla 4. Combinaciones de reguladores del crecimiento BAP/ANA y K/2,4-D empleados para el cultivo de hojas, yemas apicales y yemas laterales de *M. grandiflora* en medio MM.

BAP ó K mg/l	ANA ó 2,4-D mg/l				
	0	1	2	3	5
0	1	2	3	4	5
0.25	6	7	8	9	10
0.50	11	12	13	14	15
0.75	16	17	18	19	20
1.0	21	22	23	24	25
2.0	26	27	28	29	30
3.0	31	32	33	34	35

En una segunda etapa, se tomaron hojas completas de *M. dealbata* desarrolladas a partir de plántulas que habían sido previamente germinadas *in vitro* las cuales median 2.0 a 3.0 cm. éstas fueron disectadas en secciones de 1.0 - 1.4 cm de longitud y sembradas en el medio WP adicionado de dos citocininas y una auxina. BAP/K/2,4-D en diferentes combinaciones (Tabla 5).

Tabla 5 Concentraciones de los reguladores del crecimiento empleados en el cultivo de secciones de hoja de *M. dealbata* en medio WP.

Tratamiento BAP/K mg/l	2,4-D mg/l			
	0.5	1.0	2.0	3.0
0.5/0.5	1	2	3	4
1.0/1.0	5	6	7	8
2.0/2.0	9	10	11	12
3.0/3.0	13	14	15	16
5.0/5.0	17	18	19	20

Condiciones de incubación y mantenimiento de los cultivos.

M. grandiflora en medio MM.- Para todos los lotes de embriones cigóticos, yemas apicales, laterales y hojas cultivadas en el medio MM; el periodo de inducción fue de 60 días y posteriormente fueron subcultivados al mismo medio pero sin reguladores del crecimiento (medio basal 100%). Se realizaron subcultivos cada 15 días en medio basal al 50% adicionando 1 g/l de carbón activado, las condiciones controladas fueron: oscuridad total y fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico de $50 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

M. grandiflora en medio WP.- Los cultivos de yemas apicales, laterales y hojas de *M. grandiflora* en medio WP el periodo de inducción fue de 30 días y posteriormente fueron subcultivados a medio basal adicionando 5 g/l de Polivinil pirrolidona (PVP) en cada uno de los subcultivos, mismos que se realizaron cada 30 días, estos cultivos fueron incubados en fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico de $25 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

M. dealbata, embriones en medio MM y WP.- Los embriones cigóticos de *M. dealbata* tuvieron un periodo de inducción de 60 días, después fueron subcultivados a medio basal adicionando 5 g/l de PVP en cada subcultivo, los cuales se realizaron cada 30 días, en estos lotes se ensayaron las condiciones de fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico de $25 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y oscuridad a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

M. dealbata en medio WP.- Todos los lotes de yemas apicales, yemas laterales, hojas y secciones de hojas de *M. dealbata* cultivados en el medio WP tuvieron un periodo de inducción de 30 días, posteriormente todos los explantes fueron transferidos a medio basal (sin reguladores del crecimiento) suplementado con 5 g/l de PVP; estos lotes de *M. dealbata* fueron incubados en fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico de $25 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

En todos los lotes se realizaron observaciones semanales para poder registrar las posibles respuestas morfogénicas (formación de callo, brotes, raíces, embriones somáticos). Llevando siempre un registro fotográfico del desarrollo de ambas especies.

RESULTADOS.

Germinación de embriones de *M. grandiflora* en medio MM.

La germinación de embriones cigóticos maduros se presentó de forma diferencial, al parecer estuvo influenciada por el baño en L-Norleucina (Tabla 6). De manera general la germinación de los embriones empezó a ser evidente alrededor del sexto día de la siembra, los embriones se hincharon por la hidratación adquirida y a partir del décimo al doceavo día los cotiledones y cuerpo del embrión comenzaron a elongarse. Los embriones que no germinaron no mostraron ningún cambio, solamente adquirieron una coloración oscura (amarillo-café) la cual al paso de los días se tornó más oscura, hasta llegar a un café oscuro intenso.

Tabla 6 Porcentajes de germinación de embriones cigóticos maduros de *M. grandiflora* pre-tratados por 2 horas con 3 diferentes concentraciones de L-Norleucina y sembrados en medio de cultivo MM (26° C, fotoperiodo 16h, 50 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 3 meses.

Tratamiento	L-Norleucina [μM]	No. embriones germinados / No. de embriones totales	Porcentaje de germinación
1	0	12/20	60
2	1	16/20	80
3	5	6/20	30

En el tratamiento control, el porcentaje de germinación fue de 60%. Los embriones después de 23 días de cultivo comenzaron a presentar áreas más oscuras (oxidación), principalmente en la radícula y más tarde en las primeras hojas desarrolladas (Figura 3). Los explantes fueron subcultivados por tres meses después de los cuales alcanzaron aproximadamente 0.9 cm de largo. Posteriormente el crecimiento fue muy lento y poco después adquirieron el mismo tono café oscuro de los tejidos oxidados; al transcurrir entre 4 y 5 meses las plántulas murieron al parecer debido a la fuerte oxidación.



Figura 3 Durante la germinación de los embriones cigóticos de *M. grandiflora* en el medio MM, la oxidación de los tejidos se manifestó como una pigmentación café–negro.

El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento 2 pretratado con L-norleucina ($1 \mu\text{M}$), en donde se logró el 80% de germinación (Figura 4a). La oxidación para este caso no representó problemas significativos, es decir, sólo en algunos casos se pudo observar indicios de oscurecimiento del tejido, las plántulas se observaron vigorosas durante los 3 meses de cultivo, logrando desarrollar plántulas con una altura promedio de 1.9 cm y con 2 a 3 hojas. Se logró el establecimiento de 3 plántulas en condiciones de invernadero (Figura 4b); ésto representó el 15% de sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas germinadas *in vitro* bajo las condiciones ensayadas para el tratamiento No. 2 Sin embargo, después de 2 meses en el invernadero las plántulas se perdieron debido a la contaminación por plagas (pulgón blanco).

El porcentaje de germinación más bajo (30%) se obtuvo en el tratamiento 3 ($5 \mu\text{M}$) donde el desarrollo de las plántulas en general fue muy pobre, alcanzando, después de tres meses, solamente 0.9 a 1.1 cm de longitud con evidente clorosis, además las plántulas presentaron un oscurecimiento de sus tejidos, no se presentó sobrevivencia *ex vitro*.

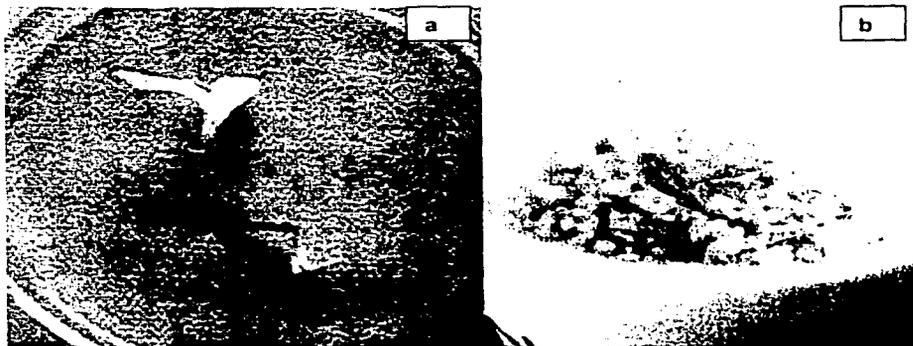


Figura 4 Los baños con L-Norleucina, L-Cisteina, Ac. Ascórbico y Ac. Cítrico disminuyeron la oxidación, lo que permitió obtener: a) plántulas vigorosas y b) plantas con sobrevivencia *ex vitro*.

Cultivo de embriones cigóticos de *M. grandiflora*

La respuesta predominante de los embriones sembrados en medio de cultivo MM basal y adicionado con BAP/2,4-D en 4 combinaciones (0/0, 0.25/2, 1/2, 1/1, 2/1 mg/l) fue el desarrollo de callo, del cual sólo en el tratamiento 0.25/2 BAP/2,4-D se obtuvo la diferenciación de brotes y raíces, en los demás tratamientos no fue posible obtener otra respuesta, mientras que en el lote control sólo se obtuvo el 50% de germinación (6 embriones), los explantes que no presentaron ninguna respuesta se perdieron por necrosis después de transcurrir tres semanas de cultivo.

En los 4 tratamientos adicionados con diferentes concentraciones de BAP/ 2,4-D (0.25/2, 1/2, 1/1, 2/1 mg/l), el desarrollo de callo fue evidente a partir del noveno al décimo día de cultivo, éste se formó preferentemente en la superficie de los cotiledones y fue más evidente en el tratamiento con 2/1 mg/l de BAP/2,4-D. El aspecto del callo fue esponjoso, hialino y húmedo, de color verde claro con zonas de color blanco. El crecimiento del callo fue muy acelerado, a los 20 días de cultivo alcanzó 1.2 cm³ aproximadamente (el tamaño inicial del embrión fue de 4-5mm).

Después de 3 semanas de iniciado el experimento en el tratamiento 0.25/2 mg/l, BAP/2,4-D se pudieron observar en el callo pequeñas estructuras de células alargadas que posteriormente se compactaron y formaron una o

varias pequeñas masas celulares que al cabo de 6 semanas se diferenciaron en pequeños haces que formaron raíces.

Transcurrido un mes de cultivo en este mismo tratamiento (0.25/2 mg/l de BAP/2,4-D) en tres explantes que formaron callo a partir de la región apical del embrión, se observaron pequeñas estructuras seminodulares, éstas tenían un aspecto esférico y compacto de color blanquecino, que recordó las primeras etapas de la embriogénesis somática, pero que eran rápidamente cubiertas (en 4-5 días) por la proliferación de callo y en otros casos estas mismas estructuras reventaban y se desdiferenciaban nuevamente en un callo esponjoso. A las 8 semanas de cultivo, en 6 de los embriones originalmente sembrados (ahora callos) en este tratamiento, se diferenciaron pequeñas hojas de 6-8 mm de longitud que después de 6-10 días más se consolidaron como brotes, en 2 de estos 6 callos se desarrollaron 2 brotes (Figura 5) y en los otros 4 sólo se desarrolló un brote por cada porción de callo. Solamente en dos brotes fue evidente el desarrollo de raíces, en los demás brotes no se tuvo la certeza de que las numerosas raíces que se formaron en el callo tuvieran conexión directa con los brotes (Figuras 6).



Figura 5 A partir de embriones cigóticos de *M. grandiflora* cultivados en medio MM con 0.25/2 mg/l de BAP/2,4-D se obtuvo la regeneración de uno o más brotes por O.I. en algunos de los explantes.



Figura 6 Al cultivar embriones cigóticos de *M. grandiflora* con 0.25/2 de BAP/2,4-D se logró la diferenciación de brotes y de varias raíces mediados por un callo. La presencia de callo no permitió determinar si hubo conexión directa entre el brote y la raíz.

El principal problema que se presentó para el cultivo de embriones cigóticos de *M. grandiflora* fue la fuerte oxidación, ya que al parecer, los tejidos liberan y acumulan una gran cantidad de compuestos fenólicos. Esta oxidación se registró como una pigmentación de color café oscuro a partir de la tercera semana de cultivo, inicialmente en la región apical y posteriormente la pigmentación llegaba al resto del embrión y tejido desarrollado hasta llegar a acumularse en el medio de cultivo. Debido a lo anterior, los explantes tuvieron que ser subcultivados a medio MM 50% después de dos meses; a los siguientes subcultivos se les adicionó carbón activado (1 g/l). Lamentablemente la oxidación no se logró reducir y la mayoría de los tejidos terminaron necrosados, sólo fue posible aislar y mantener 12 porciones de callo: 8 provenientes del tratamiento 0.25/2 mg/l (BAP/2,4-D) de las cuales, 6 presentaron los brotes y raíces regenerados por O.I. y otras 4 porciones de callo del tratamiento 1/1 mg/l de BAP/2,4-D.

Después de 4 meses de subcultivos periódicos los brotes regenerados fueron separados, se retiró la mayor cantidad de callo y se mantuvieron en medio MM al 50% adicionado con carbón activado (1 g/l) durante 2 meses, el callo restante fue cultivado en medio de inducción 0.25/2 BAP/ANA sin embargo no se obtuvieron respuestas morfogenéticas y a los pocos meses se perdieron por oxidación del tejido. Las plántulas regeneradas al igual que los demás explantes presentaron regiones con indicios de oxidación, siendo más marcada en las raíces y en las porciones de callo restantes, lo que ocasionó que fuera difícil su mantenimiento *in vitro*, por lo que, las plántulas de aspecto vigoroso se intentó establecerlas en condiciones de invernadero. Se sembraron en vasos de unicel de 8 cm de diámetro por 10 de profundidad, el sustrato empleado fue agrolita, las plántulas fueron regadas con la misma formulación del medio MM al 50% sin sacarosa y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación que los cultivos *in vitro*. Las plántulas no sobrevivieron más de 2 1/2 semanas.

Cultivo de embriones cigóticos de *M. dealbata*

Al parecer la condición de incubación es uno de los factores que influye fuertemente en la obtención de respuestas morfogénicas del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de *M. dealbata*, ya que los embriones expuestos a fotoperiodo no presentaron repuestas morfogénicas, sólo sufrieron una alta oxidación y necrosis, al parecer inducida por la acumulación de fenoles en el medio de cultivo. Por el contrario los embriones incubados en oscuridad en ambos medios de cultivo (WP y MM) registraron una mayor sobrevivencia y diferentes respuestas: proliferación de callo, embriogénesis somática, así como la regeneración de brotes adventicios, la necrosis por oxidación se presentó en los embriones que no germinaron o que no presentaron respuestas morfogénicas.

Cultivo de embriones de *M. dealbata* en medio MM.

Organogénesis

Al parecer los embriones de *M. dealbata* son muy susceptibles a la luz, ya que la mayoría de los lotes ensayados en esta condición se perdieron desde los primeros días de incubación (algunos desde el tercer día), los explantes sufrieron una severa necrosis ocasionada por la oxidación. En los lotes que se mantuvieron en oscuridad la respuesta fue favorable, de manera general los embriones empezaron a incrementar su tamaño después del quinto día de incubación, la mayoría de los embriones se hidrataron (hinchándose), algunos se alargaron mientras algunos otros adquirieron tonos amarillo-verdosos, principalmente los cultivados en presencia de citocininas, algunos explantes cultivados con 0.5 a 1.0 mg/l de 2,4-D presentaron el hipocótilo de color blanco e hidratado. La mejor respuesta se obtuvo en los tratamientos 3/0.1, 5/0.1, 5/0 mg/l de BAP/2,4-D en los que se obtuvieron de 2.3 a 2.1 brotes adventicios en promedio vía organogénesis directa (Figura 7), en los demás tratamientos la respuesta fue de nula o menor a 1 brote por explante. En ninguno de los tratamientos se obtuvo la proliferación de callo.



Figura 7 La formación de brotes por organogénesis directa fue una de las respuestas obtenidas en los embriones cigóticos de *M. dealbata* cultivados en medio WP.

Cultivo de embriones de *M. dealbata* en medio WP.

Organogénesis.

En los embriones cultivados en el medio WP al igual que en los cultivos en el medio MM la luz pareció condicionar la respuesta, ya que en los explantes incubados bajo fotoperiodo se presentó una fuerte necrosis disminuyendo fuertemente la sobrevivencia. En oscuridad la sobrevivencia fue superior, se presentó la proliferación de callo, regeneración de brotes, tanto por organogénesis directa como indirecta, así como, embriogénesis somática directa.

La proliferación de callo fue casi nula, únicamente en algunos explantes de los tratamientos 0.1, 0.5, 1.0 mg/l de 2,4-D, sin la citocinina, se logró una mínima proliferación; sin embargo en la mayoría de ellos su crecimiento fue muy limitado y con alta oxidación. La organogénesis directa se registró en los tratamientos que contenían 3 y 5 mg/l de BAP y en ausencia o bajas concentraciones de 2,4-D donde se obtuvieron en promedio 2.3 brotes por explante (Tabla 7). En concentraciones menores de citocininas sólo se obtuvo la germinación de los embriones. Los subcultivos periódicos en medio basal adicionado de PVP permitieron controlar la oxidación, ya que después de 5 meses se lograron obtener plántulas de 5 cm de altura.

Tabla 7 Promedio de brotes regenerados a partir de embriones cigóticos de *M. dealbata* via organogénesis directa cultivados en WP adicionado de BAP/2,4-D (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/2,4-D (mg/l)	No.de explantes con resp./expl. totales.	Brotes/explante ± D.S.
1	0/0	29/42	1.00± 0.00
2	0/0.1	0	0.00±0.00
3	0./0.5	0	0.00±0.00
4	0//1.0	0	0.00±0.00
5	1/0	32/46	1.13±0.34
6	1/0.1	10/24	1.30±0.67
7	1/0.5	3/33	1.00±0.00
8	1/1	0/21	0.00±0.00
9	3/0	17/36	1.76±1.15
10	3/0.1	10/18	2.30±0.95
11	3/0.5	1/36	1.00±0.00
12	3/1	2/24	1.00±0.00
13	5/0	16/21	2.13±1.41
14	5/0.1	14/30	2.36±1.28
15	5/0.5	0/30	0.00±0.00
16	5/1	1/21	1.00±1.00

Embriogénesis somática (ES).

Los embriones cigóticos cultivados en WP adicionados únicamente con 2,4-D presentaron las mejores respuestas, en general comenzaron a hidratarse a los pocos días de incubación tomando una coloración blanquecina, en el 25% de los embriones se presentó la proliferación de callo blanco, compacto y de aspecto húmedo, mientras que el resto presentó un aspecto rugoso de los cotiledones a partir de los cuales se obtuvo la embriogénesis somática.

La regeneración de embriones somáticos se logró a través de la vía directa y se obtuvo únicamente en los tratamientos libres de BAP y que contenían 0.5 y 1.0 mg/l de 2,4-D. El primer cambio evidente de los embriones fue la hidratación general del embrión a los pocos días de cultivo, posteriormente adquirieron una superficie rugosa. Después de 30 días presentaron la formación de nódulos, los cuales después de 60 días se apreciaron como pequeñas protuberancias que más tarde se consolidaron como embriones somáticos que se diferenciaron directamente del explante. Este proceso de diferenciación en algunos casos se había iniciado durante el periodo de inducción y fue mas evidente al subcultivar los explantes a medio basal, la proliferación de embriones varió, en algunos casos se formaron unos cuantos (3-10) embriones somáticos, pero en otros casos la cantidad era

superior a 50 embriones somáticos por explante. Algunos embriones somáticos debido a su desarrollo y crecimiento se desprendieron del explante y germinaron (Figuras 8).



Figura 8 La cantidad obtenida de embriones somáticos de *M. dealbata* fue alta, por lo que algunos de éstos se desprendieron de la masa de embriones y germinaron de forma espontánea.

En lo que se podría considerar como embriogénesis somática indirecta, ésta se presentó igualmente en el medio WP libre de BAP y en combinación con 0.1, 0.5, 1.0 mg/l de 2,4-D, obteniendo mejores resultados con 0.5 y 1.0 mg/l., aproximadamente 1 de 4 de los embriones que presentaron respuesta formaron un callo compacto húmedo de color blanco que al ser subcultivado a medio basal presentó regiones en las que se empezaron a diferenciar pequeños nódulos de color blanquecino (Figura 9) que después de 90 días dieron origen a embriones en fase globular, posteriormente se alargaron para pasar a la fase cotiledonar, en donde se pudo apreciar claramente el desarrollo del cuerpo del embrión, así como de los cotiledones (Figuras 10), muchos callos presentaron zonas oscuras que con el tiempo se necrosaron, presumiblemente por la acumulación de compuestos fenólicos, sin embargo al ser subcultivados a medio fresco adicionado de PVP en algunas regiones se repetía el proceso de diferenciación pero con menores cantidades de embriones regenerados.



Figura 9 La diferenciación de los embriones somáticos de *M. dealbata* se presentó dentro de los primeros 60 días de cultivo e inició con la formación de pequeños nódulos de color blanquecino.



Figura 10 En los cultivos de embriones somáticos de *M. dealbata* en medio WP con 0.5-1.0 mg/l de BAP/2,4-D se pudieron apreciar los diferentes estadios (fase cotiledonar) de desarrollo de éstos, lo que se vió favorecido al subcultivar los embriones a medio basal.

La germinación de los embriones somáticos fue muy rápida, después de pasar por la fase cotiledonar y principalmente al separarlos de la masa de ES, la gran mayoría comenzó a germinar, el 58.33% no presentó alteraciones aparentes en el número de cotiledones, es decir, se formaron dos y la germinación fue similar a la obtenida por embriones cigóticos; el 10.52% de los embriones somáticos solamente desarrollaron un cotiledon, el 12.5% desarrollaron 3 cotiledones y el 14.5% presentaron los cotiledones fusionados, sin embargo estas anomalías no limitaron la sobrevivencia y desarrollo de los embriones, ya que el desarrollo de hojas verdaderas se presentó igual en todos los casos y similar al obtenido mediante la germinación de embriones cigóticos. Después de 5 meses de cultivo se obtuvieron plántulas con tallas de hasta 5 cm de longitud.

Cultivo de yemas apicales y laterales de *M. grandiflora* en medio MM.

La respuesta de las yemas apicales y laterales fue muy baja, en la mayoría de los casos se presentó una fuerte oxidación de los explantes a partir de la segunda semana de forma más evidente en las yemas laterales, en donde la oxidación fue letal para la totalidad de los explantes. Para el caso de las yemas apicales únicamente en los tratamientos 0.25/2, 0.5/1, 0.75/2, 1/1 y 1/2 mg/l de BAP/ANA (tratamientos 8, 12, 18, 22, y 23; Tabla 4) se indujo formación de callo, el cual fue de aspecto friable de color blanco a hialino, posteriormente se tornó a un color café-amarillo. El tratamiento que desarrolló una mayor cantidad de callo (1.48 cm³) fue el que contenía 1/2 mg/l de BAP/ANA (Tabla 8).

Tabla 8 Crecimiento promedio de callo a partir de yemas apicales de *M. grandiflora* en medio MM adicionado de diferentes concentraciones de BAP/ANA (26° C, fotoperiodo 16h, 50 µMol m⁻² s⁻¹), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA mg/l	Explantos con reps/expl. Totales	Crec. Prom. ± D.S.	Porcentaje de oxidación
8	0.25/2	6/6	1.43±0.41	80
12	0.5/1.0	2/6	0.42±0.61	80
18	0.75/2.0	5/6	1.20±0.59	80
22	1.0/1.0	6/6	1.40±0.28	80
23	1.0/2.0	6/6	1.48±0.52	20

Después de tres semanas de cultivo el callo presentó indicios de oxidación, los tejidos se tornaron de amarillo a café oscuro por lo que fue necesario subcultivarlos de manera frecuente para tratar de evitar o minimizar este proceso, en la mayoría de los casos el callo al ser subcultivado a medio fresco se fragmentó incrementado con ello la oxidación, posiblemente por la liberación de compuestos fenólicos acumulados. En la octava semana y sólo después de adicionar al medio 100 mg/l de L-cisteína se logró que se desarrollaran nuevos callo blanco y esponjoso (Figura 11).



Figura 11 Una constante que se presentó al cultivar yemas apicales y laterales de *M. grandiflora* en medio MM fue la necrosis de los tejidos, el callo desarrollado presentó regiones de color amarillo a café que tornó después a negro derivado de la oxidación.

Organogénesis

A partir de la décima a la doceava semana en el tratamiento que contenía 0.25/2 mg/l de BAP/ANA, se desarrollaron 9 brotes por organogénesis indirecta (3 brotes en 3 diferentes explantes), así como 4 brotes (2 por explante) en el tratamiento 0.5/1 mg/l de BAP/ANA; en el tratamiento 0.75/2 mg/l de BAP/ANA se diferenciaron 3 brotes completos en 1 solo explante y 1 hoja en 4 diferentes explantes, todos a través de organogénesis indirecta (Figuras 12); en los tratamientos 1/1 y 1/2 mg/l de BAP/ANA la respuesta sólo fue la proliferación de callo.

Los brotes y hojas diferenciados no pudieron ser individualizados del callo, porque al realizar esta operación morían después de dos semanas; al transcurrir 16 semanas las plántulas regeneradas que permanecieron unidas a callo murieron por oxidación de todo el explante.



Figura 12 La regeneración de brotes se logró en *M. grandiflora* al cultivar yemas apicales con 0.25/2 y 0.75/2 mg/l de BAP/ANA en medio MM.

Cultivo de yemas apicales de *M. grandiflora* en medio WP.

Las yemas apicales cultivadas en el medio WP adicionado de BAP/ANA en 25 combinaciones (Tabla 3) mostraron una sobrevivencia muy baja al cultivo *in vitro*, solo en 16 de los 25 tratamientos ensayados se presentó el crecimiento de la yema apical (germinación del meristemo); en 10 diferentes tratamientos el 16.6% de las yemas apicales germinaron mientras en otros 6 tratamientos el 33.3% de las yemas presentaron el crecimiento de la misma como se puede ver en la Tabla 9; por lo que se tomó como respuesta cuantificable el incremento longitudinal de las yemas (que denominé brotes) las cuales presentaron crecimiento activo así como alta turgencia, hecho que permitió que en 6 tratamientos se desarrollaran brotes con 3 a 4 hojas después de 4 a 6 semanas.

El tratamiento 1/0.25 mg/l de BAP/ANA fue el que permitió alcanzar el mayor crecimiento promedio de las yemas apicales 0.6 cm (Tabla 9) se registró alta sobrevivencia en este tratamiento y aunque la oxidación se presentó en el 80% de la superficie de los explantes, no fue letal (Figura 13) y permitió la sobrevivencia y desarrollo de los brotes durante 4 meses de subcultivos.



Figura 13 Algunas de las yemas apicales de *M. grandiflora* cultivadas en medio WP presentaron el crecimiento del meristemo y hojas pre-existente aunque con alta oxidación.

Los explantes que no respondieron adquirieron un color café oscuro a negro, sufriendo necrosis total de los tejidos en tres semanas.

Tabla 9 Crecimiento promedio de yemas apicales de *M. grandiflora* cultivadas en medio WP adicionado con BAP/ANA (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA mg/l	Explantos con resp / expl. totales.	% de yemas germinadas	Crecimiento promedio \pm D.S.
2	0/0.25	1/6	16.6	0.21 \pm 0.53
3	0/0.5	2/6	33.3	0.43 \pm 0.67
6	1/0	1/6	16.6	0.30 \pm 0.73
7	1/0.25	2/6	33.3	0.60 \pm 0.92
8	1/0.5	2/6	33.3	0.41 \pm 0.68
9	1/1.0	2/6	33.3	0.38 \pm 0.59
10	1/3.0	1/6	16.6	0.34 \pm 0.71
11	2/0	1/6	16.6	0.18 \pm 0.44
12	2/0.25	2/6	33.3	0.36 \pm 0.46
13	2/0.5	2/6	33.3	0.26 \pm 0.58
14	2/1.0	1/6	16.6	0.17 \pm 0.40
16	3/0	1/6	16.6	0.23 \pm 0.51
17	3/0.25	1/6	16.6	0.21 \pm 0.71
18	3/0.5	1/6	16.6	0.18 \pm 0.42
19	3/1.0	1/6	16.6	0.21 \pm 0.71
23	5/0.5	1/6	16.6	0.22 \pm 0.69

Cultivo de yemas laterales de *M. grandiflora* en medio WP.

El cultivo de las yemas laterales de *M. grandiflora* registró baja o nula respuesta morfogénica y la sobrevivencia de los explantes fue muy baja. sólo en los tratamientos 1/0, 1/0.25, 1/1, 2/0.25, 2/0.5, y 2/1 mg/l BAP/ANA la sobrevivencia fue mayor al 50% (Tabla 10). La mejor respuesta de los cultivos se presentó en el tratamiento con 1 mg/l de BAP, en donde todos los explantes presentaron crecimiento del meristemo y de las hojas pre-existentes, así como el máximo desarrollo de las yemas (1.36 cm de longitud en promedio). En este mismo tratamiento un explante después de 7 a 8 semanas de cultivo, desarrolló una raíz vía organogénesis indirecta esta raíz se originó de una porción de callo blanco esponjoso que proliferó en la base del brote, en otro explante de este mismo tratamiento se diferenciaron dos hojas a través de organogénesis indirecta después de nueve semanas de cultivo. Esta diferenciación fue la más notable ya que el callo del cual se diferenciaron las hojas presentó severa necrosis, el resto de los explantes de este tratamiento registraron oxidación aproximadamente del 80% sin ninguna respuesta morfogénica.

En el tratamiento 2/0.25 de BAP/ANA la sobrevivencia de los explantes fue del 100%, sin embargo el crecimiento fue muy limitado y no hubo respuesta morfogénica, el crecimiento del callo fue muy lento, principalmente de la base de los explantes. En el tratamiento 0/1.0 de BAP/ANA se diferenciaron 3 raíces en un explante vía organogénesis indirecta; mientras que en el tratamiento 1/0.25 de BAP/ANA se diferenciaron 2 hojas en un explante después de 8 a 9 semanas de cultivo y una hoja se diferenció en otro explante a partir de un callo altamente oxidado a las 10 a 11 semanas de cultivo.

En los demás tratamientos el crecimiento de los brotes cultivados fue limitado y con oxidación alta, la proliferación de callo friable sólo se presentó en los tratamientos 2/1, 3/0 y 3/0.5 de BAP/ANA, después de 6 a 7 semanas se presentó una fuerte oxidación en el callo, su crecimiento fue limitado y estuvo confinado a la base de los brotes desarrollados; en todos los casos el callo generado terminó oxidado después de varios meses de subcultivos.

Tabla 10 Crecimiento promedio de yemas laterales de *M. grandiflora* cultivadas en medio WP adicionado con diferentes concentraciones de BAP/ANA (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses.

Tratamiento	BAP/ANA (mg/l)	Explantos con resp/expl. Totales	Crecimiento promedio \pm D. S.	Porcentaje de oxidación
2	0/0.25	1/6	0.13 \pm 0.32	50
3	0/0.5	2/6	0.35 \pm 0.54	80
4	0/1.0	1/6	0.21 \pm 0.53	80
6	1/0	6/6	1.36 \pm 0.54	80
7	1/0.25	3/6	0.39 \pm 0.43	80
8	1/0.5	3/6	0.55 \pm 0.61	80
9	1/1.0	4/6	0.29 \pm 0.23	80
10	1/3.0	2/6	0.23 \pm 0.35	80
12	2/0.25	6/6	0.38 \pm 0.11	80
13	2/0.5	4/6	0.32 \pm 0.26	50
14	2/1.0	4/6	0.42 \pm 0.33	80
15	2/3.0	2/6	0.21 \pm 0.38	80
16	3/0	1/6	0.11 \pm 0.28	50
17	3/0.25	2/6	0.19 \pm 0.30	20
18	3/0.5	1/6	0.08 \pm 0.20	20
19	3/1.0	2/6	0.16 \pm 0.25	80
23	5/0.5	1/6	0.06 \pm 0.15	80

Cultivo de yemas apicales de *M. dealbata* en medio WP.

El cultivo de yemas apicales de *M. dealbata* registró una respuesta muy baja, ya que sólo en 7 de los 25 tratamientos ensayados se obtuvo el desarrollo de los explantes sembrados (Tabla 11). Las respuestas obtenidas fueron similares a las obtenidas con yemas apicales de *M. grandiflora*, es decir, el desarrollo del meristemo apical para formar el primer par de hojas y en algunos casos el ápice continuó su crecimiento y desarrolló más hojas.

Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos 2/0.5 y 3/0.25 mg/l BAP/ANA en donde la sobrevivencia fue del 50% y en los cuales el crecimiento promedio de los explantes cultivados alcanzaron 0.70 y 0.78 cm respectivamente, algunos brotes alcanzaron tallas de 1.6-1.8 cm con 3-4 pares de hojas en 4 meses, estos brotes mostraron un aspecto turgente y vigoroso (Figura 14) especialmente los que fueron cultivados con 2/0.5 mg/l de BAP/ANA.



Figura 14 Las yemas apicales de *M. dealbata* cultivadas en medio WP sólo registraron el crecimiento del meristemo y hojas de la yema en algunos tratamientos sin proliferación de callo.

En los tratamientos 0/0.5, 1/3, 3/0.5, 5/0 y 5/1 mg/l de BAP/ANA el crecimiento de los explantes fue menor (Tabla 11), de igual forma la sobrevivencia fue más baja (33%). En estos tratamientos que registraron el desarrollo del meristemo apical, no fue posible inducir la proliferación de callo ni de ningún proceso morfogénético.

Al parecer la oxidación de las yemas apicales fue el factor que limitó la sobrevivencia, ya que se perdieron la mayoría de los cultivos de estos explantes, sólo en los tratamientos antes mencionados la oxidación fue baja (alrededor del 20 %).

Tabla 11 Crecimiento promedio de yemas apicales de *M. dealbata* cultivadas en medio WP con diferentes concentraciones de BAP/ANA (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA mg/l	Explantos con resp/expl. totales	Crecimiento promedio \pm D. S.	Porcentaje de oxidación.
3	0/0.5	2/6	0.38 \pm 0.56	20
10	1/3.0	2/6	0.56 \pm 0.88	80
13	2/0.5	3/6	0.78 \pm 0.85	20
17	3/0.25	3/6	0.70 \pm 0.79	50
18	3/0.5	1/6	0.11 \pm 0.28	20
21	5/0	2/6	0.56 \pm 0.61	50
24	5/1.0	2/6	0.61 \pm 0.64	0

Cultivo de yemas laterales de *M. dealbata* en medio WP.

Las yemas laterales cultivadas *in vitro* no presentaron respuesta, todos los tratamientos del lote se perdieron después de 3 semanas, en todos los explantes se observó el oscurecimiento de los tejidos hasta llegar a un color negro resultado de la necrosis ocasionada por la oxidación.

Cultivo de hojas de *M. grandiflora* en medio MM.

Las hojas cultivadas en el medio MM presentaron respuesta muy baja, en el lote con diferentes concentraciones de K/2,4-D sólo con 0.25/2 mg/l se obtuvo la diferenciación de raíces vía organogénesis directa (Figura 15) a partir de una hoja sembrada que presentó muy alta oxidación.



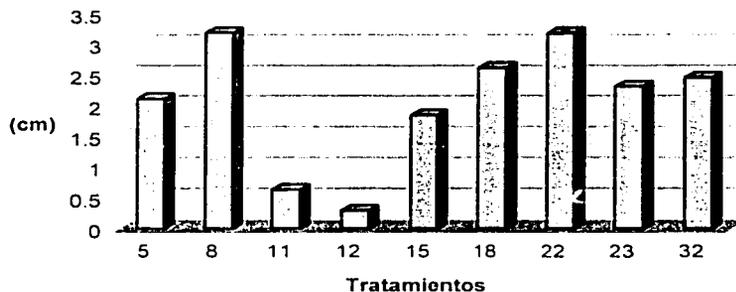
Figura 15 La oxidación fue letal en la mayoría de las hojas de *M. grandiflora* cultivadas en medio MM con K2,4-D; sólo en una hoja con alta oxidación se pudo obtener la formación de raíces.

En 9 de los 35 tratamientos con diferentes concentraciones de BAP/ANA 0.25/2, 0.5/0, 0.5/1, 0.75/2, 1/1, 1.0/2, 3/1 5/0 y 5/0.5 mg/l presentó crecimiento de la hoja, callo o la diferenciación de algún órgano (hoja o raíz); en los tratamientos 0.25/2 y 1/1 de BAP/ANA la sobrevivencia fue del 100%, los explantes desarrollaron un callo esponjoso a partir de la 3ª semana de iniciado el cultivo, en ambos tratamientos se registró el mayor crecimiento longitudinal promedio de hojas cultivadas 3.19 y 3.18 cm respectivamente (Gráfica 1).

En el tratamiento 0.25/2 mg/l de BAP/ANA 5 explantes desarrollaron en cada uno de ellos, de 2 a 3 raíces vía organogénesis indirecta después de la sexta semana de cultivo, el proceso de rizogénesis se inició con un conglomerado de células hialinas y alargadas que se diferenciaron a partir de un callo esponjoso formando cordones que se condensaron y compactaron para posteriormente originar pequeñas raíces de aproximadamente 3-4 mm, en todos los explantes la oxidación se presentó en el 80% de la superficie de los tejidos.

Gráfica 1 Crecimiento longitudinal promedio de la lámina de la hojas de *M. grandiflora* cultivadas en medio MM con diferentes concentraciones de BAP/ANA (26° C, fotoperiodo 16h, 50 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

CRECIMIENTOS PROMEDIO DE HOJA DE *M. grandiflora*



En 4 explantes del tratamiento 0.5/0 mg/l de BAP/ANA se registró la formación de una hoja vía organogénesis indirecta, el callo presentó una oxidación del 80%. En el tratamiento 0.5/1 mg/l de BAP/ANA se desarrollaron 2 brotes, uno en cada explante; en el tratamiento 0.75/2 mg/l de BAP/ANA se logró la formación de 8 brotes por organogénesis directa a partir de dos explantes (3 en uno y 5 en otro), de igual forma se registró la formación de raíces directamente del explante (Figura 16). El callo del cual se diferenciaron los brotes presentaba una oxidación del 80% o más de su superficie, en los demás tratamientos sólo se registró el crecimiento de callo altamente oxidado.

Los brotes y hojas diferenciadas se pudieron mantener durante 4 meses haciendo subcultivos periódicos en medio MM 50% adicionado con carbón activado (1 g/l) sin embargo poco tiempo después murieron por necrosis total de los tejidos.



Figura 16 A partir del cultivo de hojas de *M. grandiflora* en medio MM con 0.75/2 mg/l BAP/ANA se diferenciaron raíces por O. D.

Cultivo de hojas de *M. grandiflora* en medio WP.

Las hojas cultivadas en WP tuvieron una baja sobrevivencia, este medio al parecer provocó en la mayoría de las hojas necrosis severa, presentando nula regeneración, sólo en pocos explantes de los tratamientos 0/1, 1/0, 1/0.25, 1/0.5, 2/0, 2/3, 3/0, 5/0.25 y 5/3 mg/l de BAP/ANA se desarrolló callo esponjoso después de la tercera semana, el callo se desarrolló principalmente en la zona del corte.

La baja y errática sobrevivencia, así como el limitado crecimiento de las hojas cultivadas no permitió realizar una evaluación que permitiera establecer una correlación entre el mayor crecimiento y sobrevivencia con respecto a una concentración óptima de reguladores del crecimiento ensayados; en los tratamientos 0/1, 1/0, 1/0.5, 2/0, 3/0 y 5/3 mg/l de BAP/ANA se registró el mayor crecimiento longitudinal de las hojas cultivadas, 1.41, 1.42, 1.63, 1.60, 1.52 y 1.41 cm respectivamente (Tabla 12), en los demás tratamientos los incrementos de tamaño de la hoja fueron menores y no hubo formación de callo; en todos los explantes trabajados se presentó oxidación, misma que cubrió del 50 al 80% de su superficie.

La oxidación de los explantes se registró a partir de la tercera semana, acentuándose durante la semana 4 - 5, las hojas fueron subcultivadas a medio basal adicionado de 5 g/l de polivinilpirrolidona, reduciendo de manera significativa la oxidación, lo que permitió mantener las hojas por 3 meses, posteriormente los cultivos se perdieron en su totalidad.

Tabla 12 Crecimiento longitudinal promedio de hojas de *M. grandiflora* en WP adicionado de BAP/ANA (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA mg/l	Explantos con respuesta/ expl. totales	Crecimiento Promedio ± D.S	Porcentaje de oxidación
1	0/0	4/12	0.86 ± 0.78	80
2	0/0.25	4/12	1.20 ± 0.84	80
3	0/0.5	4/12	0.71 ± 0.92	80
4	0/1.0	4/12	1.41 ± 1.02	50
5	0/3.0	3/12	1.12 ± 0.96	80
6	1/0	10/12	1.42 ± 0.83	80
7	1/0.25	8/12	1.17 ± 1.06	80
8	1/0.5	11/12	1.63 ± 1.12	50
9	1/1.0	5/12	0.76 ± 0.91	80
10	1/3.0	4/12	0.58 ± 0.58	50
11	2/0	7/12	1.60 ± 0.84	50
12	2/0.25	7/12	1.32 ± 0.97	80
13	2/0.5	6/12	0.96 ± 1.01	80
14	2/1.0	4/12	1.26 ± 1.11	50
15	2/3.0	10/12	1.18 ± 1.38	80
16	3/0	7/12	1.52 ± 0.98	50
17	3/0.25	8/12	1.14 ± 1.12	80
18	3/0.5	6/12	0.77 ± 0.83	50
19	3/1.0	4/12	0.63 ± 0.78	80
20	3/3.0	8/12	1.28 ± 0.40	80
21	5/0	8/12	1.32 ± 0.93	80
22	5/0.25	7/12	0.94 ± 0.72	50
23	5/0.5	3/12	0.56 ± 0.50	80
24	5/1.0	6/12	1.17 ± 0.95	80
25	5/3.0	6/12	1.41 ± 0.72	80

Cultivo de hojas de *M. dealbata* en medio WP.

Las hojas cultivadas en los diferentes tratamientos de BAP/ANA no presentaron repuestas morfogenéticas, después de 3 semanas las hojas se mostraron con alta turgencia y baja oxidación (alrededor del 20% de la superficie de los explantes), las hojas crecieron de manera significativa y se enroscaron girando dentro de su mismo eje (Figuras 17) debido al incremento en su talla; esto se pudo observar en 13 tratamientos.



Figura 17 Las hojas de *M. dealbata* cultivadas en medio WP con BAP/ANA registraron en su mayoría un incremento muy marcado de su talla y poca o nula oxidación.

En algunas regiones cercanas a la nervadura de la hoja, al parecer en la epidermis, se formaron pequeñas protuberancias que en ocasiones formaron pequeños nódulos compactos de color blanco a hialino (Figura 18), que después de 7-8 semanas degeneraron y sólo se observaron como cúmulos blanquecinos en los tratamientos 1/0.5, 2/0.5, 3/0, 3/0.25 y 5/0.5 mg/l de BAP/ANA.



Figura 18 En algunas hojas de *M. dealbata* bajo la influencia de 1/0.5, 2/0.5, 3/0, 3/0.25 y 5/0.5 mg/l de BAP/ANA en medio WP se presentó la formación de nódulos que recordaron las primeras fases de la embriogénesis somática, aunque más tarde algunos de esos nódulos degeneraron y otros se perdieron por la oxidación.

Los tratamientos 3/0, 1/0, 3/0.5, 3/0.25 y 0/0.25 mg/l de BAP/ANA presentaron el mayor crecimiento longitudinal de las hojas, 4.82, 4.41, 3.67, 3.43 y 3.46 cm respectivamente (Tabla 13), de igual forma en éstos tratamientos los explantes registraron alta sobrevivencia (alrededor del 80%).

En los tratamientos en que no se presentan resultados se debe a que se perdieron por contaminación, sólo en el tratamiento 5/3 mg/l de BAP/ANA la oxidación se hizo presente y las hojas murieron por necrosis.

Tabla 13 Crecimiento longitudinal promedio de hojas de *M. dealbata* cultivadas en medio WP con diferentes concentraciones de BAP/ANA (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 4 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA mg/l	No. de expl. con resp / expl. totales	Crecimiento promedio \pm D.S.	Porcentaje de oxidación.
1	0/0	6/12	1.48 \pm 2.12	20
2	0/0.25	12/12	3.46 \pm 2.27	20
3	0/0.5	8/12	2.00 \pm 2.10	20
4	0/1.0	0/12	0	100
5	0/3.0	9/12	2.57 \pm 2.60	0
6	1/0	7/12	4.41 \pm 4.27	0
7	1/0.25	0/12	0	100
8	1/0.5	5/12	1.47 \pm 3.13	20
9	1/1.0	5/12	3.00 \pm 4.15	20
10	1/3.0	5/12	2.12 \pm 3.58	0
11	2/0	7/12	2.76 \pm 2.82	20
12	2/0.25	8/12	1.93 \pm 1.93	0
12	2/0.5	7/12	2.26 \pm 2.49	20
14	2/1.0	7/12	1.71 \pm 2.10	20
15	2/3.0	6/12	1.83 \pm 2.87	20
16	3/0	12/12	4.82 \pm 2.32	0
17	3/0.25	12/12	3.43 \pm 2.39	20
18	3/0.5	10/12	3.67 \pm 2.50	0
19	3/1.0	4/12	0.56 \pm 0.88	0
20	3/3.0	0/12	0	100
21	5/0	9/12	2.06 \pm 1.92	20
22	5/0.25	7/12	0.93 \pm 1.02	50
23	5/0.5	4/12	1.17 \pm 3.13	50
24	5/1.0	7/12	1.25 \pm 1.48	20
25	5/3.0	0/12	0	100

Cultivo de secciones de hojas de *M. dealbata* en medio WP adicionado de BAP/K/2,4-D.

En los diferentes tratamientos de las secciones de hojas cultivadas en el medio WP adicionado de dos citocininas y una auxina (BAP/K/2,4-D) en diferentes combinaciones (Tabla 4) no se presentaron respuestas morfogénicas favorables, esto es, la diferenciación de algún órgano o la proliferación de callo morfogénico; sólo fue posible observar el crecimiento en las secciones de las hojas cultivadas.

Los resultados obtenidos sólo muestran la capacidad de las hojas para incrementar su tamaño aún después de los cortes realizados, esto lo podemos ver expresado en todos los tratamientos ensayados en los cuales sobresalen el crecimiento promedio de las secciones de hojas alcanzado en los tratamientos 1/1/0.5, 1/1/1 y 3/3/1 mg/l de BAP/K/2,4-D en los que el crecimiento de las secciones de hoja alcanzaron de 4 a 5 cm² y no presentaron oxidación (Tabla 14); además de que presentaron alta sobrevivencia. Sólo en los tratamientos 0.5/0.5/3 y 2/2/2 mg/l de BAP/K/2,4-D la oxidación se presentó como un problema ya que ésta cubrió aproximadamente el 80% de la lámina de la hoja, en ambos casos la sobrevivencia fue baja y el crecimiento promedio de las secciones de hoja fue bajo; en los demás tratamientos la oxidación también fue baja aunque los crecimientos promedios fueron menores como se puede ver en la Tabla 14.

Tabla 14 Crecimiento promedio de secciones de hoja de *M. dealbata* cultivados en medio WP adicionado con dos citocininas y una auxina (BAP/K/2,4-D) en diferentes concentraciones (21° C, fotoperiodo 16h, 25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultados al término de 3 meses de iniciados los cultivos.

Tratamiento	BAP/ANA/2,4-D mg/l	No. de expl. con resp / expl. totales	Crecimiento promedio \pm D. S.	Porcentaje de oxidación.
1	0.5 / 0.5 / 0.5	4/11	1.15 \pm 0.49	0
2	0.5 / 0.5 / 1.0	7/11	1.86 \pm 2.66	0
3	0.5 / 0.5 / 2.0	7/11	1.83 \pm 0.63	20
4	0.5 / 0.5 / 3.0	2/11	1.03 \pm 0.97	80
5	1.0 / 1.0 / 0.5	8/11	3.80 \pm 1.09	0
6	1.0 / 1.0 / 1.0	10/11	5.02 \pm 1.32	0
7	1.0 / 1.0 / 2.0	8/11	2.30 \pm 1.01	20
9	2.0 / 2.0 / 0.5	10/11	2.50 \pm 0.99	20
10	2.0 / 2.0 / 1.0	7/11	2.80 \pm 0.39	0
11	2.0 / 2.0 / 2.0	3/11	1.96 \pm 1.03	80
13	3.0 / 3.0 / 0.5	6/11	3.30 \pm 0.53	20
14	3.0 / 3.0 / 1.0	7/11	4.30 \pm 1.07	0
17	5.0 / 5.0 / 0.5	8/11	2.51 \pm 0.87	0
18	5.0 / 5.0 / 1.0	4/11	2.91 \pm 1.55	20

DISCUSIÓN.

Una de las fases más difíciles del cultivo *in vitro* es el establecimiento de cultivos asépticos y de forma particular los cultivos a partir de estructuras somáticas de plantas adultas que provienen de poblaciones (George y Sherrington, 1984), por lo que las semillas son la fuente de explantes más común para obtener cultivos libres de organismos contaminantes, debido a que el proceso de desinfección de éstas es más sencillo y eficaz, pero también más enérgico (George y Sherrington, 1984; Ault y Blackmon, 1987; Molphe *et al.*, 1998). En el presente trabajo la contaminación de los explantes por microorganismos patógenos no fue un factor determinante en ninguna de las dos especies trabajadas (*M. dealbata* y *M. grandiflora*) ya que sólo en muy pocos casos los explantes sufrieron contaminación.

El método de desinfección empleado en este trabajo para las semillas (embriones cigóticos), hojas, yemas laterales y yemas apicales demostró ser eficiente; las combinaciones de: detergente, alcohol (en semillas) hipoclorito de sodio adicionado con Tween 80, y enjuagues permitió eliminar los microorganismos no deseados. Quizás el empleo del Tween 80 influyó de manera significativa en el resultado ya que es un detergente-emulsificante que ataca a las ceras de las plantas y membranas celulares, lo que puede hacer más susceptible el tejido a los agentes empleados en la desinfección (Bohinsky, 1991). Por lo tanto, la contaminación en los diferentes lotes cultivados de ambas especies no fue determinante, sin embargo la necrosis de los explantes y tejidos debida quizás a la oxidación inducida por la síntesis y acumulación de compuestos fenolicos sí fue determinante en los cultivos en ambas especies y de forma más evidente en los cultivos de *M. grandiflora*.

Una vez superada la fase de desinfección de los explantes (semillas, yemas apicales, yemas laterales y hojas) se ensayó la adición de diferentes agentes reductores (ver metodología) para intentar inhibir o reducir la oxidación, como resultado de éste ensayo sólo se obtuvieron porcentajes de 60%, 80% y 30% de germinación de los embriones pre-tratados con los agentes antioxidantes (Tabla 6); como lo reportado en el cultivo de yemas apicales de *Musa textilis* (Mante y Tepper, 1983) en donde se obtuvo la proliferación de brotes adventicios al reducir la oxidación mediante el uso de L-cisteína.

Los resultados obtenidos muestran que los mayores porcentajes de germinación *in vitro* (60%) se registraron en el tratamiento control y en el tratamiento de 1 μ M de Nor-leucina fue de 80% de germinación; al contrastarlo con los resultados obtenidos por Le Page-Degivry (1970) para *M. grandiflora*, quien obtuvo el 50% de germinación *in vitro* en embriones aislados e incubados en condiciones de alta luminosidad 2000 - 2200 lux, a 22-26 °C y 87% de germinación en oscuridad; las diferencias no son tan grandes por lo que se decidió no someter a los demás explantes al pre-tratamiento con los agentes antioxidantes; sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo mejoran a los reportados por Vovides e Iglesias (1996) para *M. dealbata*, quienes reportaron un porcentaje máximo de 40 % de germinación a 13-32 °C manteniendo las semillas, en invernadero sin ningún tipo de escarificación o pre-tratamiento para inducir germinación.

Los embriones cigóticos maduros de *M. grandiflora* cultivados en el medio de cultivo MM con los reguladores del crecimiento BAP/2,4-D presentaron de forma muy acentuada la oxidación en explantes y tejidos, permitiendo sólo la diferenciación de 8 brotes en el tratamiento 0.25/2 mg/l de BAP/2,4-D así como la proliferación de callo friable con la presencia de estructuras nodulares que no fueron capaces de continuar su diferenciación debido a la alta oxidación. La alta mortalidad de explantes cultivados *in vitro* es un problema común en especies leñosas de angiospermas como *Acacia nilotica* ssp. *indica* (Yusuf *et al.*, en prensa); *Ceiba pentandra* (Uribe, 1998) y de gimnospermas como *Cerotozamia mexicana* (Chávez, 1993); *Picea chihuahuana* (Mata, 2000) y *Pinus sylvestris* (Laukkanen *et al.*, 1999) son algunos ejemplos de ello. Igualmente se presenta este problema en angiospermas leñosas tropicales y subtropicales (Litz y Jaiswal, 1991) como *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis* y *E. nitens* (McComb, 1995); *Hevea brasiliensis* (Housti *et al.*, 1991); *Musa textilis* (Mante y Tepper, 1983) y varias especies de la familia Magnoliaceae (Callaway, 1996).

Al no ser posible la inhibición o reducción de la oxidación, presumiblemente por el depósito y acumulación de compuestos fenólicos, en los tejidos en *M. grandiflora* cultivados *in vitro*, mediante los subcultivos frecuentes y con la adición de carbón activado al medio de cultivo (1g/l), la

muerte por necrosis en los tejidos fue el factor determinante para el establecimiento de cultivos a partir de embriones cigóticos de esta especie.

En el establecimiento de los embriones cigóticos maduros de *M. dealbata* las condiciones de cultivo: medio de cultivo, agentes antioxidantes y condiciones de incubación así como el genotipo, estado fisiológico y la edad de la planta madre favorecieron de forma determinante las respuestas morfogénicas obtenidas, como lo han documentado acuerdo Bonga, (1981); George y Sherrington, (1984); George, (1993); Bergmann y Stomp, (1994).

En los embriones cultivados de *M. dealbata* en el medio de cultivo MM adicionado de 5 g/l de PVP se logró inducir la organogénesis directa en los tratamientos 3/0.1, 5/0 y 5/0.1 mg/l de BA/2,4-D en condiciones de oscuridad a 21 ± 1 °C, de igual forma en los cultivos de embriones cigóticos de ésta especie cultivados en WP adicionado de 5 g/l de PVP se obtuvo organogénesis directa en los tratamientos 3/0.1 y 5/0.1 mg/l de BAP/2,4-D con 2.31 brotes promedio (Tabla 7). Los resultados obtenidos concuerdan con los de Dodds y Roberts (1982) quienes expresan que los explantes con estructuras meristemáticas cultivadas *in vitro* sujetos a altas concentraciones de citocininas responden comúnmente con la regeneración de brotes; esta respuesta se ha encontrado en *Paulownia spp.* y *Populus spp.* (Dustan y Thorpe, 1986); *Prosopis spp.* (Tabone *et al.*, 1986); *Rhododendron spp.* y *Santalum spp.* (Dustan y Thorpe, 1986), entre muchas más.

La respuesta morfogénica más importante expresada por los embriones cigóticos de *M. dealbata* fue la embriogénesis somática directa, que se obtuvo con el medio WP suplementado con 2,4-D (0.5 y 1 mg/l) y adicionado con PVP (5 g/l) e incubado en oscuridad, a 21 ± 1 °C, de igual forma en los tratamientos 0/0.1, 0/0.5 y 0/1 de éste mismo medio y condiciones de incubación se presentó embriogénesis somática, que hasta el momento no se tiene la certeza a través de que vía se presentó, si fue de manera directa o indirecta ya que al parecer en estos tratamientos la regeneración de los embriones somáticos estuvo mediada por lo que parecía un callo embriogénico, sin embargo se tiene la duda si este callo era una masa de proembriones y suspensores (PEMs) como el descrito para *Liriodendron tulipifera* (Merkle y Sommer, 1986, 1987; Merkle *et al.*, 1990; Merkle y Sommer, 1991); *M. cordata*; *M. fraseri* y *M. virginiana* (Merkle y Wiecko, 1990; Merkle 1995). La ausencia de

un estudio histológico en el presente trabajo no permitió establecer claramente la vía de regeneración de la embriogénesis somática. Sin embargo, estos resultados por si mismos representan una gran aportación para la propagación y conservación de *M. dealbata*; ya que hasta donde sabemos este es el primer reporte de regeneración exitosa para esta especie.

Las diferentes respuestas obtenidas al cultivar los embriones cigóticos de *M. dealbata* hacen evidente la variación intraespecífica que puede encontrarse en una misma población, las respuestas obtenidas quizás se deban al genotipo, sin embargo las diferencias se incrementaron al parecer por las condiciones de incubación; ya que los cultivos mantenidos en oscuridad presentaron una mayor sobrevivencia, menor oxidación y mejores respuestas morfológicas que los embriones cultivados en fotoperiodo. Por lo que podemos decir que la luz es un factor determinante para el cultivo de embriones cigóticos de *M. dealbata*. De acuerdo con George y Sherrington (1984) y George (1993) la exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas oxidativas y por tanto la biosíntesis de los compuestos fenólicos responsables de la muerte de los tejidos. Para reducir o prevenir la oxidación se recomienda mantener a los cultivos en oscuridad por 14 días o más antes de ser transferidos a baja intensidad luminosa.

Un factor que se puede considerar contribuyó a las diferencias encontradas es el tipo de medio de cultivo ya que los embriones cultivados en el medio MM presentaron menor regeneración y mayor oxidación de los tejidos con respecto a los embriones cultivados en el medio de cultivo WP. La diferencia entre las formulaciones de los medios de cultivo MM y WP pudo ser un factor que modulara las respuestas morfológicas. Lo anterior lo podemos decir porque al analizar las formulaciones de los medios de cultivo encontramos que el medio MM contiene una mayor cantidad de compuestos nitrogenados que se ven reforzados por el hidrolizado de caseína, rico en aminoácidos, nitrógeno, nitratos, amonio, fósforo, calcio y microelementos contenidos en el medio; además de la mayor concentración de sacarosa, algunos de estos compuestos y elementos son sustrato de las enzimas catecol-oxidasa y polifenol-oxidasa durante la síntesis de los compuestos fenólicos, hidroxifenólicos y melánicos que se producen en las células de todas las plantas (Siqueira *et al.*, 1991); mientras que el medio WP presenta en su

formulación menores cantidades de los compuestos nitrogenados, no contiene hidrolizado de caseína y contiene menor cantidad de sacarosa, reduciendo con ello, la cantidad de sustratos disponibles para las enzimas productoras de los compuestos fenólicos; por lo que la oxidación de los explantes cultivados en el medio WP se vería reducida. A este respecto Biedermann (1987) reportó que al parecer la reducción de algunas sales minerales, especialmente las fuentes de nitrógeno, han favorecido la formación de brotes adventicios en ápices de *M. stellata*. En otras especies como: *Diospyros kaki* (Segiura *et al.*, 1986); *Castanea sativa* (Piagnani y Eccher, 1988) y *Prunus avium* (Righetti *et al.*, 1988) se ha determinado que es necesario reducir las sales minerales para contribuir a bajar los niveles de oxidación al disponer de menores cantidades de sustratos de las enzimas oxidativas como la catecoloxidasa y la polifenoloxidasa. McCulloch (citado por Callaway, 1996) sugiere ajustar las sales y los reguladores de crecimiento para cada una de las especies. Al considerar el análisis de la formulación de los medios de cultivo y sus posibles implicaciones en el cultivo de los embriones cigóticos de *M. dealbata* podemos suponer que los explantes se vieron favorecidos por el uso del medio WP. En apoyo a este punto cito el trabajo de Tobe (1990) quien reportó resultados exitosos en *M. grandiflora* cultivada en el medio de cultivo WP.

Al intentar hacer una comparación de los resultados obtenidos en las dos especies trabajadas, ésto resulta muy complicado ya que la variación interespecifica, es decir, de especie a especie parece ser muy grande pues el estado fisiológico y edad de las plantas madre no estuvo determinado. Por otro lado las condiciones de incubación (luz y temperatura) y combinaciones de los reguladores del crecimiento y el número de embriones por tratamiento fueron diferentes, esto último debido a la disposición del material biológico; igualmente los agentes antioxidantes empleados fueron distintos. Por lo que en realidad no se puede hacer una comparación de los resultados obtenidos en el cultivo de embriones cigóticos de ambas especies.

Las yemas laterales de *M. grandiflora* en el medio de cultivo MM presentaron alta oxidación y casi todos los tratamientos se perdieron al sufrir los explantes severa necrosis, lo mismo sucedió con las yemas laterales de *M. dealbata* cultivadas en el medio WP.

En *M. grandiflora* las yemas laterales cultivadas en WP presentaron la proliferación de callo en tratamientos con 1 a 2 mg/l de BAP y con 0.25 a 1 mg/l de ANA, así como la formación espontánea de raíces y el crecimiento muy limitado de las yemas en algunos tratamientos (Tabla 10). Las respuestas obtenidas en el cultivo de yemas laterales de ambas especies hace ver que estas yemas son incapaces de romper con la dominancia apical, no expresando capacidad morfogénica y sólo se obtuvo un crecimiento muy limitado en los pocos casos en que hubo sobrevivencia. Al parecer la interacción entre los compuestos fenólicos (como inhibidores endógenos) y los reguladores del crecimiento endógenos y exógenos estuvo dominada por los primeros, lo que pudo inhibir el metabolismo de las yemas afectando directamente su crecimiento. Como resultado de la acumulación de los compuestos fenólicos se provocó la oxidación y necrosis como lo reportó Sequeira *et al.* (1991). Los resultados obtenidos en estos explantes contrastan con lo reportado en otras especies, en donde ha sido común la micropropagación a partir de yemas laterales con el uso de varias citocininas o bien con la alta concentración de una de ellas (Debergh y Read, 1991).

Los cultivos de yemas apicales de *M. grandiflora* en medio MM presentaron muy baja sobrevivencia, en sólo en 5 de 35 tratamientos ensayados se registró la proliferación de callo morfogénico en bajas concentraciones de BAP 0.25-1 mg/l y de 1-2 mg/l de ANA (Tabla 8), así como la formación de brotes vía organogénesis indirecta en el tratamiento 0.25/2 y 0.75/2 mg/l de BAP/ANA. Los cultivos de las yemas apicales de *M. grandiflora* y *M. dealbata* cultivadas en el medio WP presentaron una sobrevivencia muy baja, el crecimiento del meristemo y hojas preexistentes en los tratamientos con 1 a 5 mg/l de BAP y 0.25 a 1 mg/l de ANA (Tablas 9 y 11 respectivamente) así como la formación de muy reducida callo. De estos resultados se puede resaltar que al igual que en las yemas laterales, los reguladores endógenos de la planta no permitieron que las células en las yemas apicales pudieran adquirir capacidad morfogénica y sólo fue posible que se expresara en algunos casos el crecimiento de meristemas y hojas, es decir, que continuara la dominancia apical de las yemas en *M. dealbata* y *M. grandiflora*, lo anterior fue reportado por Brown y Sommer (1980) quienes señalan que las yemas tienen mayor capacidad de regenerar estructuras diferenciadas ya que estos explantes

cuentan con regiones meristemáticas y hormonas endógenas como el AIA que promueven dicha diferenciación. Los resultados obtenidos en el cultivo de las yemas apicales y laterales de *M. dealbata* y *M. grandiflora* coinciden con algunos reportes en los cuales las yemas se pueden elongar en altas concentraciones de citocininas como en: *Eucalyptus terricornis* (Mascarenhas *et al.*, 1982); en Solanaceae se reporta su multiplicación a partir de yemas laterales en concentraciones altas de BAP (Binding y Krumbiegel-Schroeren, 1984); en *Alnus sp* (Dustan y Thorpe, 1986); y *Prosopis sp.* (Tabone *et al.*, 1986); así como en *Rhododendron sp.* y *Ulmus sp.* (Dustan y Thorpe, 1986).

El cultivo de hojas de *M. grandiflora* en medio MM presentó al igual que en los cultivos de embriones y yemas, muy baja sobrevivencia y alta oxidación, esto queda claro al analizar los resultados obtenidos, ya que a excepción de 1 hoja cultivada en 0.25/2 mg/l de K/2,4-D todos los demás explantes cultivados con este mismo medio y reguladores del crecimiento se perdieron por la severa necrosis provocada por la alta oxidación. Las hojas de *M. grandiflora* cultivadas en medio MM adicionado de diferentes combinaciones de BAP/ANA presentaron igualmente alta oxidación; sin embargo en el tratamiento 0.25/2 mg/l de BAP/ANA se registró la formación de 2-3 raíces vía organogénesis indirecta en 5 explantes y en el tratamiento 0.75/2 se diferenciaron 8 brotes por O. l., todos con alta oxidación; el resto de los explantes se perdieron por la severa necrosis registrada.

Cuando las hojas de *M. grandiflora* fueron cultivadas en el medio WP con BAP/ANA en diferentes combinaciones y adicionado de 5 g/l de PVP en los subcultivos, la respuesta fue un poco diferente ya que la sobrevivencia fue mayor en los diferentes tratamientos y los niveles de oxidación fueron menores que los observados en el medio MM, la proliferación de callo fue muy reducida y se presentó en los tratamientos 0/1, 1/0, 1/0.25, 1/0.5, 2/0, 2/3, 5/0.25 y 5/3 mg/l de BAP/ANA al parecer de forma espontánea ya que no fue posible establecer una relación entre la respuesta obtenida con respecto a las concentraciones ensayadas. La respuesta más notable se expresó en el crecimiento de la lámina de las hojas cultivadas, estos crecimientos se observaron en los tratamientos que contenían altas concentraciones de BAP 1 a 5 mg/l con 0.5 a 3 mg/l de ANA (Tabla 12); de igual forma no fue posible establecer una correlación entre las combinaciones de los reguladores del

crecimiento con respecto a los mayores crecimientos alcanzados, sin embargo al parecer las altas concentraciones, 1 a 5 mg/l BAP, favorecen el mayor crecimiento, aunque esta evaluación es subjetiva y está lejos de ser una afirmación.

Al hacer una comparación de los resultados obtenidos al cultivar hojas de *M. grandiflora* en los medios MM y WP se puede inferir que las condiciones de incubación, el medio de cultivo y los agentes antioxidantes utilizados, son determinantes para el establecimiento, mantenimiento y proliferación de los explantes cultivados, ya que los resultados obtenidos en las hojas cultivadas en el medio MM y sus condiciones de incubación permitieron la formación de brotes por organogénesis indirecta; sin embargo estos brotes y todas las hojas se perdieron debido a la severa necrosis provocada por los altos niveles de oxidación, la cual al parecer fue favorecida por la formulación misma del medio de cultivo (ver discusión de embriones cigóticos) así como por las condiciones de incubación, mientras que las hojas cultivadas en el medio WP presentaron mayor sobrevivencia que las hojas cultivadas en MM. Estos resultados seguramente fueron promovidos por el uso del PVP como agente antioxidante y por las condiciones de incubación (densidad de flujo fotónico de $25 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$) como lo sugieren George y Sherrington (1984) quienes han documentado que la exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas oxidativas y por tanto la biosíntesis de los compuestos fenólicos responsables de la muerte de los tejidos, recomiendan mantener los cultivos en oscuridad por 14 días y posteriormente transferirlos a baja intensidad luminosa, con el fin de reducir o prevenir la oxidación de los cultivos. Por lo anterior se puede decir que el medio de cultivo WP adicionado con PVP y las condiciones de incubación favorecieron el desarrollo de hojas cultivadas de *M. grandiflora* a diferencia de lo ocurrido en el medio de cultivo MM.

Los cultivos de hojas de *M. dealbata* en el medio WP presentaron bajas o nulas respuestas morfogénicas, ya que no se presentó la formación de callo y sólo en los tratamientos con 1/0.5, 2/0.5, 3/0, 3/0.25 y 5/0.5 mg/l de BAP/ANA en algunas hojas y de forma esporádica se presentó la formación de pequeños nódulos esponjosos de color blanco a hialino (Figura 19) que tiempo después degeneraron; la mayoría de las hojas cultivadas en este medio crecieron de

forma muy evidente, se registró una alta sobrevivencia en todos los tratamientos y bajos niveles de oxidación (Tabla 13). Al igual que en las hojas de *M. grandiflora* en WP, las condiciones de incubación, el medio de cultivo y el uso del PVP al parecer favorecieron los resultados obtenidos; sin embargo las concentraciones de los reguladores del crecimiento no parecieron ser las necesarias para inducir en las células de las hojas capacidad para la morfogénesis. La ausencia de respuesta morfogénica en el cultivo de hojas inmaduras ha sido reportada por Vargas (1988) quien cultivó hojas de *Chamaedorea humilis* y *Gaussia gomez-pompae* y no encontró respuesta morfogénicas obteniendo sólo la formación de un callo con alta oxidación; Das (1992) reportó que no había obtenido respuesta morfogénica en el cultivo de hoja de *Agave sisalana* en presencia de BAP.

En el presente estudio las secciones de hoja de *M. dealbata* cultivadas en el medio WP fueron sometidas a la interacción de altas concentraciones de 2 citocininas y 1 auxina (BAP/K/2,4-D) esperando que la acción sinérgica de estos reguladores del crecimiento pudieran inducir la diferenciación de órganos; sin embargo la respuesta no fue la esperada y al parecer la respuesta fue más pobre que en las hojas cultivadas con sólo una auxina, ya que en ninguno de estos casos se forma un callo ni otra respuesta morfogénica. lo que hace suponer que dos individuos pueden dar respuestas morfogénicas muy distintas cuando se les sujeta a condiciones de cultivo similares. lo mismo pasa cuando se utilizan diferentes estadios fisiológicos, diferentes órganos y diferentes tejidos o diferentes especies (Constabel, 1984; George, 1993).

A pesar de que las hojas inmaduras son un tipo de explante comúnmente utilizado en *Musa*, *Euphoria longan* y *Santalum album* (Lakshmi Sita, 1986), las hojas de *M. dealbata* no presentaron respuestas morfogénicas favorables. Dentro de los resultados obtenidos se destaca que los procesos de oxidación que presentan las magnolias, no fueron un factor determinante para el establecimiento de las hojas de esta especie ya que la oxidación se pudo controlar con el uso de PVP al realizar los subcultivos.

Las diferencias entre las respuestas de yemas, hojas y embriones cigóticos hacen evidente que el tipo de explante a utilizar puede jugar un papel importante en la obtención de una respuesta morfogénica deseada (Constabel, 1984). La fuerte oxidación registrada en las yemas apicales, yemas

laterales, hojas y embriones de *M. grandiflora* confirman que la oxidación es una respuesta asociada al cultivo de plantas leñosas (Litz y Jaiswal 1991).

Antes de destacar la falta de respuesta de las yemas y hojas sería necesario utilizar otras condiciones de cultivo como son; el tipo de medio, los agentes antioxidantes, las condiciones de incubación y los reguladores del crecimiento que permitan la evolución de los nódulos que se presentaron en el tratamiento 0.25/2 mg/l de BAP/2,4-D en embriones cigóticos de *M. grandiflora* y en algunas hojas de *M. dealbata* en medio WP como lo recomiendan Debergh y Read (1991).

CONCLUSIONES.

El método de desinfección (agentes desinfectantes, enjuagues y tiempos de desinfección) para las semillas, yemas apicales, yemas laterales y hojas fue muy eficiente ya que la contaminación fue muy baja o nula; por lo que se puede recomendar este método para futuros trabajos con *M. dealbata* y *M. gradiflora* y especies similares.

A partir del cultivo de embriones cigóticos en medio WP adicionado con 2,4-D (0.5 y 1.0 mg/l), se logró la formación y desarrollo de embriones somáticos. La embriogénesis somática fue, principalmente por vía directa y posiblemente a través de la formación de PEMs, lo que aún no se puede confirmar debido a la ausencia de un análisis histológico que detalle el desarrollo del "aparente" callo morfogénico formado en los tratamientos 0.1, 0.5 y 1.0mg/l de 2,4-D en los cultivos de embriones somáticos de *M. dealbata*.

La germinación *in vitro* de *M. grandiflora* fue exitosa al obtener porcentajes de 60 a 80% muy cercanos a los reportados por Le Page-Degivry (1970) y al mejorar los alcanzados por Vovides e Iglesias (1996).

El medio de cultivo WP favoreció la sobrevivencia y desarrollo de los explantes cultivados en él.

Las diferencias encontradas entre las dos especies trabajadas pudieron ser debidas a variaciones genotípicas interespecíficas y los diferentes resultados obtenidos dentro de una misma especie igualmente se debieron quizás a la variación intraespecífica.

La adición de PVP como agente antioxidante en los subcultivos permitió reducir los niveles de oxidación en los explantes cultivados.

Las condiciones de incubación en oscuridad durante los primeros 30 días de cultivo y de fotoperiodo de 16 h con una densidad de flujo fotónico de

25 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $21\pm 1^\circ\text{C}$ en los siguientes meses de cultivo favorecieron la expresión de la embriogénesis somática en *M. dealbata*.

La regeneración de brotes de *M. grandiflora* en el medio MM fue errática y sólo se logró en muy pocos casos con 0.25/2 mg/l de BAP/2,4-D al cultivar embriones cigóticos y también con 0.252 mg/l de BAP/ANA al cultivar yemas apicales. El carbón activado (1 g/l) empleado en éstos medios no fue capaz de reducir los niveles de oxidación.

Las hojas y yemas cultivadas de *M. dealbata* y *M. grandiflora* no presentaron respuestas morfogénicas, por lo que se recomienda ensayar otras condiciones de cultivo como son: el tipo de medio, los agentes antioxidantes, las condiciones de incubación y los reguladores del crecimiento.

Debido a los favorables resultados logrados en *M. dealbata*, el Cultivo de Tejidos Vegetales se confirma como una importante alternativa para la conservación de esta especie, ya que los cultivos establecidos tienen un alto potencial para ser propagados de forma masiva.

A partir de los cultivos logrados en *M. dealbata* se podría proporcionar suficiente material biológico para realizar estudios genéticos que posteriormente permitan realizar estudios encaminados a su reintroducción y podría ser propagada de manera comercial a fin de reducir la presión en las poblaciones naturales de esta especie.

APÉNDICE 1

Medio de cultivo MM empleado para *M. dealbata* y *M. grandiflora*.

Macros Blaydes (Witham <i>et al.</i> , 1971)	mg/l
KNO ₃	1000
NH ₄ NO ₃	1000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	35
KCl	65
KH ₂ PO ₄	300
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	347
Micros (del medio MS)	
MnSO ₄ ·H ₂ O	6.06
ZnSO ₄ ·/H ₂ O	4.0
H ₃ BO ₃	2.0
KI	0.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Fierro MS	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.250
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.850
Vitaminas (Gresshoff and Doy, 1972)	
Inositol	100
Tiamina	10000
Acido nicotínico	1000
Piridoxina	1000
Biotina	2000
Hidrolizado de caseína	1000
Sacarosa	40 g/l
pH	5.7 g/l

APÉNDICE 2

Medio de cultivo WP empleado para *Magnolia grandiflora*.

Macronutrientes	mg/l
NH ₄ NO ₃	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	556
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	96
Micronutrientes	
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.250
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.850
Vitaminas	
Tiamina	0.1
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Inositol	100
Glicina	2.0

Sacarosa	30 g/l
Phytigel	2.7 g/l
Polivinilpirrolidona	5 g/l

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar M.E., F.Engelmann and N. Michaux-Ferriere. 1993. Cryoconservation of cell suspension of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *Cryo-letters*. 14(4) : 217-228.
- Ahuja M.R. 1993. Micropropagation à la carte In: M.R. Ahuja (eds). *Micropropagation of woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp. 3-9.
- Ammirato P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. En : C.E. Green. D.A. Somers, W.P. Hackett and D.D. Biesboer (Eds.) *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan. R. Liss, Inc. New York, 57:57-81.
- Anónimo, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial*, 6 de marzo 2002, México, D.F. 82 p.
- Assy-Bah B. and F. Engelmann. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-letters* 13(2): 117-126.
- Attree, S. M. and L. C. Fowke. 1991. Micropropagation through Somatic Embryogenesis in Conifers. En Y. P. S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin 53-70.
- Ball, E. 1950. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 14: 295-325.
- Bar-Nun N and A.M. Mayer. 1983. Suppression of Catechol Oxidase by Nor-Leucina in Plant Suspension Cultures. *Phytochemistry*. 22(6): 132-1333.

- Bastidas Ramirez, B.E., N. Navarro Ruiz, J.D. Quezada Arellano, B. Ruiz Madrigal, M.T. Villanueva Michel y P. Garzon. 1998. Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L. in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 61(2):143-52
- Bhojwani, S.S., Razdan M.K. 1983. Plant tissue culture: theory and practice Elsvier Science Publisher.
- Biedermann, I. E.G. 1987 Factors affecting establishment and development of magnolia hybrids *in vitro*. *Acta Horticulturae* 167: 426-431.
- Bohinsky R. 1991. Bioquímica. Addison Wesley Iberoamericana, México D.F. 321 pp.
- Bonga J.M. and P. von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 236 p.
- Brand, M.H. and R.D. Lineberger. 1992. Micropropagation of American Sweetgum *Liquidambar styraciflua*. In Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 18. High-Tech and Micropropagation II Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 3-24.
- Callaway, D. J. 1996. The World of Magnolias. Portlan, Oregon, Timber Press. pp. 35-62
- Caro, T. M. y and M. K Laurensen. 1994. Ecological and Genetic Factors in Conservation: a cautionary tale. *Science* 263: 485-486.
- Chalupa V. 1987. European hardwoods. In: J.M. Bonga and D.J. Dorzan (eds) Cell in Tissue Culture In forestry Vol. 3 case: Gymnosperms, Angyosperms, Palms, Mertinus. Nijhoff publisher. Dordrech. pp. 224-246.
- Chávez, V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de foliolos juvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. Robusta (MIQ) DYER

(ZAMIACEAE) en peligro de extinción. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. 148 p.

Clark, A.M., F.S. El-Feraly, and W.S. Li. 1981. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 70(8):951-952

Constabel, F. 1984. Callus culture: induction and maintenance pags. 27-35 In: Indra K. Vasil (ed) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol I Academic press Inc. Orlando, Florida.

Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 31: 253-255

DeProft, M. P., J.M. Ludo and P.C. Debergh. 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* culture *in vitro*. *Physologia Plantarum* 65: 375-379.

De Winnaar, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12: 305-312.

Dirr, M.A and C.W. Heuser. 1987. *The Reference Manual of Woody Plant Propagation*. Athens, GA: Varsity Press. A good reference for methods on propagation. Includes a section on propagation of magnolias.

Dodds, J. H. 1991. Conservation of plant genetic resources, the need for tissue culture. En: J. H. Dodds (Ed.). *In vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Chapman and Hall, London. pp 1-10.

Dodds, J. and L. W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge Univ. Press, U.S.A. 178 p.

Dood, T. III. 1980. Paying a call on Dealbata. *Magnolia* Vol. XVI 1: 29-32.

Drew, R. A. 1988. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. HortScience 23: 609-611.

Drew, R.A., B.W. Simpson, and W J. Osborne. 1991. Degradation of exogenous indole – 3- butyric acid and riboflavin and their influence on rooting response of papaya *in vitro*. Plant cell Tissue Organ Cult 26: 29-34.

Ecker, L. 1989. Long Term Maintenance of Desert Diversity: Rare Plant reintroduction. Agave. 3 : 6-8.

Ehrlich P.R. and E.O. WILSON. 1991 Biodiversity Studies: Science and Policy. Science 253: 758-762.

Ellis D.G. 1988. Propagation new magnolia cultivars. Proceedings of the International Plant Propagators Society 38: 453-456.

Endress, R. 1994. Plant Cell Biotechnology, springer-Verlag berhn-heidelberg.

Engelmann F. 1991a. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspension 2: influence of post-thaw culture conditions and application to different strains. Cryo-letters. 13(1) 15-22.

Engelmann F. 1991b. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. Euphytica. 57(3) 227-243.

Eunn G.C., Yue L.H., Haeng H.K. Ramanatha Rao V. and F. Engelmann. 2001. Cryopreservation of *Citrus madurensis* zygotic embryonic axes by vitrification: Importance of pregrowth and preculture conditions. Cryo-letters. 22(6): 391-396.

Ficht, M. M. M. 1991. Development of genetic transformation system in papaya. PhD Thesis, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii.

Ficht, M. M. M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32: 205-211.

Ficht, M. M. M. and R. M. Manshardt. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Rep.* 9: 320-324.

Ford-Loyd B. and M. Jackson. 1986. *Plant Genetic Resources: an introduction to their conservation and use.* Edward Arnold, Baltimore. USA.

Frankham, R. 1995. Conservation Genetics. *Ann. Rev. Genetics.* 29: 305-327.

Furmanowa M. and M. Redowski. 1979. *Liriodendron tulipifera* L. in tissue culture. *Acta Pol. Pharm.* 36 (2): 261-262.

Gamborg O.L. 1982. Callus and Cell Culture, en *Plant Tissue Culture Methods.* L.R. Wetter y F. Constabel (eds.). National Research, Saskatoon, Canada. 1: 1-9.

Garcia, E. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la Republica Mexicana) México, D.F. UNAM, México. 71 p.

George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Exagetic Limited, England. 709 p.

George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. 1. The Technology .* Exegetics Limited, 574 p.

González-Arno M.T., M.A. Cárdenas-Lara y C. Urrua-Villavicencio. 1997. Crioconservación de callos embriogénicos de *Citrus sinensis* var. Pineapple. *Indices de la Revista BIOTAM.* Vol. 8, (2-3).

Groenewald, E.G., D.C. Wessels and A. Koelman. 1977 Callus formation and subsequently plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae) Z. Pflanzen Physiol. 81: 369-373.

Gutiérrez L. y A.P. Vovides. 1997. An *in situ* study of *Magnolia dealbata* Zucc. In Veracruz State: an endangered endemic tree of Mexico. Biodiversity and Conservation. 6: 89-97.

Gutiérrez L. 1993. Estudio biológico de una especie forestal endémica (*Magnolia dealbata* Zucc.) Msc. Thesis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L. México. 104 p.

Hernández-Cerda M.E. 1976. Magnoliaceae de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 47 p.

Hernández-Cerda M.E. 1980. Magnoliaceae. Flora de Veracruz Fasc. 14 México: INIREB. 14 p.

Heywood, V. H. 1992. Efforts to conserve tropical plants- A global Perspective. In: R. P. Adams and J. E. Adams (Eds.). Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology, Academic Press, Inc. San Diego California. 14 p.

Hilton-Taylor, C. (compiler) 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xviii + 61 pp.

IUCN 1987. Secretaria para la Conservación en Jardines Botánicos. presentación, Centro de Monitoreo para la Conservación. Kew. U.K.

Johnstone, J.H. 1995. Asiatic Magnolias in Cultivation. London: The Royal Horticultural Society.

Johnson, D. 1989. Nomenclatural changes in *Magnolia*. *Baileya*. 23(1): 55-56.

Kartha K. 1981. Meristem culture and crypreservation methods and applications. In: T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York. 181-211 pp.

Kyte, L. 1987. Plants from Test Tubes. Timber Press, Oregon. 149 p.

Komamine, A.M, Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K. and T. Fujimura. 1992. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Cell Cultures: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. *In vitro Cell Dev. Biol.* 28: 11-14.

Komamine, A. M, Matsumoto, M. Tsukahara, A. Fujiwara, R. Kawahara, M. Ito, J. Smith, K. Nomura and Fujimura. 1990. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Cell Cultures-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. In: H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk (Eds.). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dorecht. pp. 307-313

Lakshmi Sita G. 1986. Sandalwood (*Santalum album* L.). In: Y.P.S. Bajaj (eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Trees I. Springer- Verlag, Heidelberg. pp. 363-374.

La Rue C.D. 1948. Regeneration in the Megagametophyte of *Zamia floridana*. *Bull. Torrey Bot. Club* 75: 597-603.

Le Page-Degivry, M.T. 1970. Seed dormancy associated with embryo inmaturity: contribution for study of *Magnolia soulangiana* soul. B. W. and *Magnolia grandiflora* L. by means of *in vitro* culture. *Planta* 90: 267-271.

Leslie C. and G. McGranahan. 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In: Y. P. S. Bajaj (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 136-150.

Little, Elbert L., Jr. 1979. Checklist of United States trees (native and naturalized). U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 541. Washington, DC. 375 p.

Litz, R. E. 1986. Papaya (*Carica papaya* L.). In: Y. P. S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 1. Trees Springer, Berlin Heidelberg, New York. pp. 220-232.

Litz, R. E. and R. A. Conover. 1983. High frequency Somatic Embryogenesis from *Carica* suspension cultures. Ann. Bot. 51: 683-686.

Litz R.E. and V. Jaiswal. 1991. Micropropagation of tropical and Subtropical Fruits. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic publishers, Dordrecht. pp. 247-263.

Maene, L. and P.C. Debergh. 1985a. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. Plant cell Tissue Organ Culture 5: 23-33.

Maene, L. and P.C. Debergh. 1995b. Problems related to *in vivo* rooting *in vivo* propagated shoots. Advances in Agricultural Biotechnology 14: 59-72.

Mante S. and H.B. Tepper. 1983. Propagation of *Musa textilis* Neè plants from apical meristem slices *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2: 151-159.

Martínez D.D. y M.A. Revilla. 1999. Crioconservación de ápices de tallos de *Olea europea* L. var. Arbequina. Cryoletters. 20: 29-37.

Martínez-Palacios, A. 1998. Evaluación genética y demográfica de Agave victoria-regine T. Moore y aplicación del Cultivo de Tejidos para su conservación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. 123 p.

Mata, R. M. 2000. Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. 123 p.

McGranahan G.h., Driver J.A. and Tuleche W. 1987. Tissue culture of Junglans In: Bonga and D.J. Dorzan (eds.) Cell in Tissue Culture In forestry Vol. 3 case: Gymnosperms, Angyosperms, Palms, Mertinus. Nijhoff Publisher. Dordrecht pp 236-270.

McCown, D. and McCown B.H. 1987. North american Hardwood In: Bonga and D.J. Dorzan (eds.) Cell in Tissue Culture In forestry Vol. 3 case: Gymnosperms, Angyosperms, Palms, Mertinus. Nijhoff publisher. Dordrecht. pp. 247-260.

Merkle S.A. 1995. Somatic Embryogenesis in Magnoliacea (*Liriodendron and Magnolia*). 1991. In: Y. P. S. Bajaj (Ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 30. Somatic Embryogenesis and Syntethic Seed I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 388-403.

Merkle, S.A and H.E. Sommer. 1986. Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendro tulipifera*. Can. J. For. Res. 16: 420-422.

Merkle, S.A and H.E. Sommer. 1987. Regeneration of *Liriodendro tulipifera* (FAMILY MAGNOLIACEAE) from protoplast culture. Amer. J. Bot. 74(8): 1317-1321

Merkle, S.A and H.E. Sommer. 1991. Yellow – poplar (*Liriodendron spp.*). In: Y. P. S. Bajaj (Ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 16. Tress III. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 94-110.

Merkle, S.A. and A.T. Wiecko. 1990. Somatic embryogenesis in three magnolia species. Journal of the American Society for Horticulture Science 115 (5): 858-860.

Merkle, S.A., Wiecko .A.T., R.J. Sotak and H.E. Sommer. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. In vitro Cell Development Biology 26: 1086-1093.

Milliken, T. 1987. CITES-Japan. Threatened Plants Newsletter 18: 11-12.

Milliken, T. 1987. WWf-Japan Threatened Plants Newsletter 18: 18-19

Monaco, L.C., Mr. Sondahl, A. Carvalho, O.J. Cromo and W.R. Sharp. 1977. Applications of the tissue in the improvement of coffe. In: J. Reinert, YPS Bajaj, eds, Applied ad fundamental Aspects of the Plant Cell Tissue and Organ Culture. Sprenger-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 109-129.

Murashige, T. And F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assays with Tobacco Tissue Culture Physiol. Plant. 15: 473-497

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

Murashige, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. in: T. A. Thorpe (ed.) Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978. IAPTC. Calgary. pp. 15-26

Pattison, G. 1986. *Magnolia dealbata*. Journal of the Magnolia Soc. XXI (2): 17-18.

Pavlik, B. M., D. L. Nickrent and A. M. Howald. 1993. The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. Conservation Biology 7: 510-526.

Pattison G. 1986. *Magnolia dealbata*. J. Magnolia Soc. 21: 17-18.

- Paulet F., Engelmann F. and J.C. Glaszmann. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports*. 12(9): 525-529.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Mundi-prensa. Madrid. 326 p.
- Rajeevan, R. M. y R. M. Pandey. 1986. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 41-46.
- Reeves, D.W. and G. A. Couvillon. 1992. Micropropagation of Peach (*Prunus persica* L. Batsh). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 18. High-Tech and Micropropagation. II Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 262 - 278.
- Reid, W. V. 1992. Conserving Life's Diversity. *Environ. Sci. Technol.* 26: 1090-1095.
- Reinert J. 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaft.* 45: 344-345.
- Reuveni, O., Shlesinger, D. R. and U. Lavi. 1990. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 41-46.
- Rzedowski M. 1981. Alkaloidy w kulturze tkankowej *Liriodendron tulipifera* L. PhD.Thesis, Medical Academy, Warsaw.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana.* 14: 3-21.
- Rzedowski J. 1993. Diversity and origins of the phaneromic flora of Mexico.. En: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds.) *Biological Diversity of Mexico: origins and distribution.* Oxford Univ. Press, New York. pp. 129-144.
- Schuller A., G. Reuther, and T. Geier. 1989. Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies alba*. *Plant Cell Tiss. And org. cult.* 17: 53-58.

Scoochi A. y L.A. Mroginski. 2000. Crioconservación *in vitro* de meristemas de Paraiso Gigante de 10 clones selectos. Actas de la 11ª Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNE. p. 13.

Siqueira J.O., M.G. Nair , R. Hammerschmidt , and C.R. Safir. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 63-121.

Sharp W.R., R.I.S. Sondahl, L.S. Caldas and S.B. Marafta. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Páginas. 268-310. in: J. Janick (ed.), Horticultural Reviews, vol 2, Purdue University, Avi Publishing Co., Westport, CT.

Shatnawi M.A., F. Engelmann , A. Frattarelli and C. Damiano. 1999. Cryopreservation of apices *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). Cryo-letters. 20(1): 13-20.

Stacey N.J., K. Roberts and P Knox. 1990. Patterns of expression of the arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Plant 180: 285-292.

Stefaniak B. and A. Wozny. 1983. Investigations on the ultrastructure of the callus tissue of *Liriodendron tulipifera* L. develop *in vitro*. Acta Soc. Bot. Pol. 82 (1): 3-8.

Steward F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. Amer. J. Bot. 45: 708-708.

Thien L. 1974. Floral biology of Magnolia, Amer. J Bot. 61(10): 1037-1045.

Thorpe T.A. and I.S. Harry. 1991. Clonal propagation of conifers. Plant Tissue Culture Manual C3: 1-16.

Thorpe, T. A. and P.P. Kumar. 1993. Cellular control of morphogenesis. In: M. R. Ahuja (ed). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlads. pp. 11-29

Thorpe T.A., I.S. Harry and P.P. Kumar. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic publishers. Dordrecht. pp. 311-336.

Tisserat B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration, 79-105. En R. A. Dixon (Ed.) Plant Cell Culture, a Practical Research. IRL Press, Oxford. pp. 79-105.

Tobe J.D. 1990. *In vitro* growth of *Magnolia grandiflora* cv. Bracken's Brown Beauty. Journal of the Magnolia Society 26(1): 4-8.

Toledo V.M. and M.J. Ordoñez. 1998. The biodiversity scenario of Mexico: a review of terrestria habitats. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (ed.) Biological Diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Prees, New York. pp. 757-777.

Toledo V. M. (1988). La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. N o. 81 año 14:17-30.

Tremblay L. and F.M. Tremblay. 1991. Carbohydarte requerements 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.

Treseder N.G. 1978. Magnolias. Faber and Faber, London. 243 p.

- Uribe L.I. 1998. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento *in vitro* de Ceiba *Ceiba petandra*. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias UNAM. México 69 p.
- Valbuena I. 2000. Crioconservación de Papa. Boletín de la Papa. Vol. 2. No. 2. pp 1-3.
- van Engelen F.A., Sterk P., Booij H., Cordewener J.H.G., Rook W., Van Kammen A. and S. De Vries. 1991. Heterogeneity and cell type-specific localization of the a cell glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiol.* 96: 705-712.
- Vargas L.I. 1988. Establecimiento del cultivo *in vitro* de palmas mexicanas en peligro de extinción. Tesis de licenciatura, Fac. ciencias UNAM. 86 p.
- Vasil I. K. (1994). Automation of Plant propagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:105-108.
- Vázquez Y.C. y A.S. Orozco. 1989. La Destrucción de la Naturaleza. Fondo de Cultura Económica, Colección La Ciencia desde México, No. 83, México. 102 p.
- Vázquez J.A. 1990. Taxonomy of the genus *Magnlia* (Magnoliaceae) in México and Central America. Ms: Thesis (Botany), Univ. of Wisconsin, Madison.
- Vázquez J.A. 1994. Taxonomy of the genus *Magnlia* (Magnoliaceae) in México and Central America: a synopsis. *Britonia.* 46: 219-228.
- Villalobos J. 1987. From the Latin American desk. *Threatened. Plants Newsletter* No. 18: 10-11.
- Villalobos V.M. y F. Engelmann. 1995. *Ex situ* conservation of germoplasm using biotechnology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11 (4): 375-382.

von Aderkas P. and J.M. Bonga. 1988. Formation of haploids *Larix decidua* early embryogenesis. Amer. J. Bot. 75: 690-700.

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

Vovides A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. Biotica. 6: 219-228.

Vovides A.P. and Iglesias C. 1996. Seed Germination of *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), An Endangered Species from Mexico. HortScience 31(5): 877.

Vovides A. P. 1989. Problems of Endangered Species Conservation in México: Cycads and Example. Encephalartos 29: 29-35.

Vovides A.P. 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. Acta Botánica Mexicana. 39: 1-42.

Whitham F. H., Blayde D. F. and R. M. Devlin. 1971. Experiments in plant physiology. Van Nostrand-Reinhold, New York, 245 p.

Wilson E. O. 1989. Threats to Biodiversity. Sci. Amer. 261: 108-116.

Williams E.G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cell as embryogenic group. Am. Bot. 57: 443-462.

Williams J.T. 1989. Plant germplasm preservation: a global perspective. in: L. Knutson y A.K. Stoner (eds.), Biotic Diversity and Germplasm Preservation, global imperatives. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 81-96.

Wochok Z. (1981). The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. *Biol. Cons.* 20:83-89.

Wu Y., Zhao Y., Engelman F. and M. Zhou. 2001. Cryopreservation of kiwi shoot tips. *Cryo-letters.* 22(5): 227-284.

Zhao y., Wu Y., Engelmann F. and M. Zhou. 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *Cryo-letters.* 22(5): 321-328.

Zuccarini. 1837. *Magnolia dealbata* in Abhandlung. Akad. Muench. Math. Physic. 2: 373-378.