

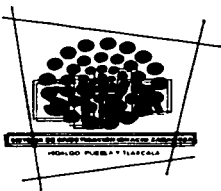


00361  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

ONTOGENIA DE BROTES ADVENTICIOS OBTENIDOS  
MEDIANTE EL CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES  
MADUROS DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)  
P R E S E N T A  
FLORENCIA TIBERIA AUCAN GARCÍA CAMPUSANO



DIRECTORA DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

MEXICO, D. F.



MARZO 2003

COORDINACIÓN

A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de noviembre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) García Campusano Florencia Tiberia Aucan, con número de cuenta 501451242, y número de expediente 0, con la tesis titulada: "Ontogenia de brotes adventicios obtenidos mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous.", bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán.

Presidente:	Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Vocal:	Dr. Víctor Manuel Chávez Avila
Secretario:	Dra. Ana Laura López Escamilla
Suplente:	Dra. Patricia Castillo España
Suplente:	Dra. Sonia Vázquez Santana

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de marzo de 2003

  
Dra. María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán.**

**El comité tutorial estuvo integrado por:**

**Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán**

**Dr. José G. Abraham Rubluo Islas †**

**Dr. Victor Manuel Chávez Ávila**

**Formó parte del proyecto "Manejo integral para la producción de plántula y conservación de *Pseudotsuga macrolepis* Flous", apoyado por el Sistema de Investigación Ignacio Zaragoza (SIZA)-CONACyT y la Fundación Produce-Tlaxcala, Clave: 19990806023. Dicho proyecto fue dirigido por la Biol. Gema L. Galindo Flores del Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.**

**Esta tesis se concluyó con una beca otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Con un enorme agradecimiento a mis padres, Cynthia Campusano Bakovic y Federico García Morales, por todo su cariño y apoyo, por siempre impulsarme a seguir creciendo. Los quiero mucho!!!!**

**A Jesús Fernández Fernández, por las palabras de aliento, por todo el camino que hemos recorrido juntos hasta ahora y por todo lo que nos falta recorrer....**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

D

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, agradezco a mi asesora la Dra. Judith Márquez por haberme abierto las puertas a su laboratorio y los ojos al "desarrollo en plantas", por su enorme apoyo y por su contagioso entusiasmo tanto en el estudio de la biología como en su quehacer diario.... MIL GRACIAS!!!

A la Biol. Gema Galindo por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis y por siempre estar pendiente de las necesidades de este trabajo. Por su amistad y confianza a lo largo de estos años.

A la memoria del Dr. Abraham Rubluc Islas, quien fungiera como mi sinodal durante los dos años que duraron mis estudios. Por sus comentarios y preguntas.

Al Dr. Victor Manuel Chávez Ávila, por todo su apoyo, sus comentarios y las sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mi jurado, la Dra. ANA Laura López Escamilla, la Dra. Sonia Vázquez Santana y a la Dra. Patricia Castillo, por la atención y el cuidado puestos en la corrección del manuscrito, por todas sus sugerencias.

A Karina Jimenez, por todo el tiempo y apoyo que me diste durante la realización de esta tesis y por tu amistad.

A Mirna, Lupita y Adriana, por siempre estar presentes, por su solidaridad y por las experiencias compartidas que nos hacen crecer...

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Micología de Tlax, especialmente al Dr. Arturo, Lupita Santiago, Alejandro, Yolanda, Aline y Martin, por siempre escuchar, por todo su cariño y ánimos. A Laura por su amistad, consejos y por todo el apoyo en la impresión de esta tesis.

Por hacerme un lugarcito en su laboratorio, las risas compartidas y las muchas recomendaciones, a mis compañeros y a mis maestros de Desarrollo en Plantas: Ulises (muchas gracias por todo!!), Lluvia, Edith, Goyo, Ricardo, Bibi, Lulu, Clarita, Dr. Laguna, Reina, Alicia, Margarita Ponce, Sonia, Citlali, Silvia, Ana Laura y Paty. A Mague, por su calidez y generosidad, por siempre tener tiempo para resolver dudas y para reír....

Al Sistema de Investigación Ignacio Zaragoza (SIZA)-CONACyT y a la Fundación Produce por el apoyo al proyecto y a esta tesis.

A todos, GRACIAS!!!

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Antecedentes	5
El género <i>Pseudotsuga</i>	5
<i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous	6
Descripción	6
Distribución	6
Usos	7
Problemática	7
Aspectos generales sobre la micropropagación	10
Establecimiento del cultivo y desarrollo de brotes	11
Micropropagación del género <i>Pseudotsuga</i>	14
Ontogenia de brotes adventicios obtenidos <i>in vitro</i>	18
Objetivos	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Materiales y métodos	29
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. macrolepis</i>	29
Técnicas histológicas	30
Resultados	32
Discusión	64
Conclusiones	79
Perspectivas	81
Bibliografía	82
Anexo	89

F

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABREVIATURAS

### Reguladores de crecimiento

<b>AIA</b>	Ácido 3-indolacético
<b>AIB</b>	Ácido 3-indolbutírico
<b>ANA</b>	Ácido $\alpha$ -naftalenacético
<b>BA</b>	N6-Benciladenina
<b>K</b>	Kinetina
<b>Z</b>	Zeatina
<b>2-iP</b>	2-isopentiladenina
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

### Medios Nutritivos

<b>MS</b>	Murashigue y Skoog
<b>SH</b>	Schenk y Hildebrandt

### Aspectos morfológicos

<b>MA</b>	Meristemo apical del tallo
<b>MR</b>	Meristemo radicular
<b>SAM</b>	Superficie del explante alejada del medio
<b>SCM</b>	Superficie del explante en contacto con el medio
<b>SL</b>	Superficie lateral del explante con respecto al medio
<b>ZM</b>	Zona meristemática



## RESUMEN

La micropropagación de árboles forestales es una alternativa importante para la propagación de especies de interés económico o en peligro de extinción. Sin embargo, para que esta tecnología pueda ser implementada como una estrategia para el mejoramiento genético y la reforestación a gran escala, existen aún muchos obstáculos que deben ser resueltos; entre los que destacan la gran variabilidad en la capacidad de respuesta morfogénica, la baja tasa de enraizamiento y de conversión a plántula. Por este motivo, resulta indispensable realizar estudios que aporten conocimientos acerca de los procesos citológicos, fisiológicos y moleculares implicados en la morfogénesis *in vitro*. En el presente trabajo se realizó un análisis histológico para estudiar la ontogenia de brotes adventicios de *Pseudotsuga macrolepis* Flous., formados a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros sobre el medio Schenk y Hildebrandt (SH), comparando dos tratamientos con reguladores de crecimiento, ANA/BA y 2,4-D/K (0.53/13.32 $\mu$ M).

Los brotes adventicios se desarrollaron vía organogénesis directa, iniciándose con la participación tanto de la protodermis como de la subepidermis del hipocotilo y cotiledones, aunque también se obtuvo una respuesta organogénica en el parénquima asociado a los haces vasculares y al meristemo radicular, especialmente en el tratamiento de ANA/BA. El patrón de desarrollo fue el siguiente: 0-5 días: divisiones celulares azarosas en el tejido; 4-6 días: divisiones celulares localizadas (agrupaciones celulares); 6-10 días: zonas meristemáticas en la superficie en contacto con el medio o promeristemoides en las superficies laterales o más alejadas del medio durante el cultivo, lo cual sugiere un papel en el establecimiento de gradientes en el tejido; 12+ días: meristemoides; 14+ días: desarrollo de la yema adventicia. La principal diferencia entre los tratamientos se relacionó al tiempo de formación de yemas, encontrándose las primeras en 2,4-D/K a los 14 días de cultivo, mientras que en ANA/BA ocurrió a los 22 días, aunque el período de formación de meristemoides se prolongó a más de 30 días, lo cual pudo haber influido en que se desarrollara un mayor número de éstos.

Este es el primer trabajo en el que se estudia en *P. macrolepis* la ontogenia de brotes adventicios formados *in vitro*. Debido a que parece tener una importante capacidad morfogénica en condiciones de cultivo y considerando su situación de especie amenazada, se recomienda continuar con estudios que permitan su micropropagación.

## SUMMARY

The histological events associated with the formation of adventitious shoots in cultured embryos of *Pseudotsuga macrolepis* Flous, were studied. Explants were cultured on Schenk and Hildebrandt growth media supplemented with a combination of Naphtalen acetic acid (NAA)/ N6-Benzyladenine (BA) or 2,4-Dichloridephenoxyiacetic acid (2,4-D)/Kinetin (K) at concentrations of 0.53/13.32 $\mu$ M.

Cytological changes related to shoot development initiated from cells in the protodermal and subepidermal layers of the explant, first in the hypocotil and later in the cotyledons, in the cell layers closest to the growth media as well as in the opposite surface; however, an organogenic response was also observed in parenchyma cells associated with the provascular system and the root meristem, especially in the explants treated with NAA/BA. The development of adventitious buds was characterized by the following events: 0-5 days: apparently random mitotic activity throughout the tissue; 4-6 days: cell divisions become restricted to the protodermal and subepidermal layers, occasionally forming clusters; 6-10 days: formation of meristematic zones in the cell layers closest to the media during culture, as well as promeristemoids in the lateral surface or in the surface furthest from the culture media; 12+ days: meristemoid formation; 14 + days: shoot bud formation. The main difference among treatments was related to the time required for shoot formation, which was of 14 days in the explants treated with 2,4-D/K and of 22 days for NAA/BA; the greater number of shoots formed with NAA/BA could have resulted from the extension of the meristemoid formation phase to over 30 days.

This study confirmed the organogenic potential of the embryos of *P. macrolepis*. However, as in most coniferous species, rooting remains the limiting step for the establishment of a method to micropropagate *P. macrolepis*, for which further research is still required.

## INTRODUCCIÓN

La propagación de especies forestales por medio del cultivo de tejidos vegetales ofrece perspectivas importantes en la producción de árboles para satisfacer, tanto el interés de las diferentes industrias por productos maderables, como las necesidades existentes de conservación y recuperación de los recursos naturales. Estas técnicas se presentan como una alternativa para la regeneración de aquellas especies cuyas poblaciones se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, así como de genotipos seleccionados por su valor económico. Por ello se ha buscado utilizar el cultivo de tejidos para la micropropagación de *Pseudotsuga macrolepis* Flous.

*Pseudotsuga macrolepis*, es una conífera que tiene un considerable potencial maderero debido a las similitudes que presenta en la calidad de su madera con *P. menziesii*, una de las especies forestales de mayor importancia económica (Goldfarb y Zaerr, 1989). Su distribución en México está restringida a pequeños sitios aislados que se pueden encontrar desde Chihuahua, Coahuila y Nuevo León hasta Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Oaxaca (Farjon, 1990; Debreczy y Rácz, 1995). Las poblaciones de Tlaxcala constituyen uno de los límites sureños de su distribución y se ubican en varias localidades de los municipios de Tlaxco, Terrenate, Emiliano Zapata y Altzayanca (Acosta-Pérez, 1992). Debido a que en muchas regiones del país esta especie ha perdido prácticamente su capacidad de regenerarse de manera natural, ha sido declarada como especie sujeta a protección especial (Anónimo, 2001).

Con la finalidad de obtener una metodología que permita la micropropagación de *P. macrolepis*, se han realizado varios trabajos a través de los cuales se han logrado obtener brotes adventicios, su crecimiento y desarrollo, a partir de cultivos de embriones maduros (Galindo-Flores comunicación personal; García-Campusano, 1999; Monjarás-González, 2001). A pesar de lo anterior, la gran variabilidad en la respuesta morfogénica y el hecho de que no se ha logrado determinar una metodología para el enraizamiento, han limitado el desarrollo de esta técnica así como su implementación a mayor escala.

Tener un mayor conocimiento de las condiciones de cultivo, particularmente del efecto que tiene el tipo y las concentraciones de reguladores de crecimiento en el control de la morfogénesis *in vitro*, determinar los sitios en el tejido que responden a los tratamientos inductores y detectar las fases de desarrollo que se presentan, resulta esencial para comprender el sistema de propagación que se propone, visualizar sus limitaciones y para plantear alternativas que ayuden a la solución de problemas, para así consolidar un sistema biotecnológico que permita la regeneración de plantas completas de esta especie. Por otra parte, realizar estudios dirigidos en este sentido son la base para el establecimiento de cualquier estrategia de transformación genética (Birch, 1997), a la vez que aportan al conocimiento ya existente información sobre los procesos estructurales, fisiológicos y moleculares implicados en la morfogénesis *in vitro*.

Por ello, se ha planteado estudiar, mediante la implementación de técnicas histológicas e histoquímicas, el desarrollo morfogénético de los brotes de *P. macrolepis*, que se obtengan a través del cultivo *in vitro* de embriones maduros, bajo dos tratamientos distintos de reguladores de crecimiento.

## ANTECEDENTES

### EL GÉNERO *PSEUDOTSUGA*

Los árboles del género *Pseudotsuga* se encuentran de manera natural en el continente Americano y en el sureste asiático (Farjon, 1990). En América se extienden a lo largo de la costa oeste de los Estados Unidos hasta México, que constituye el límite sur de su distribución a nivel mundial. Si bien en EUA las poblaciones son amplias y continuas, en México se encuentran concentrados en pequeños manchones aislados desde Chihuahua hasta Oaxaca (Espinosa, 1979; Acosta-Pérez, 1992; Debreczy y Rácz, 1995), y son evidencia de la amplitud del territorio cubierto por estos árboles en períodos geológicos anteriores, más fríos. Lo restringido de su distribución actual ha promovido que los individuos localizados en México se cataloguen como raros (Anónimo, 2001) y debido a que presentan variaciones de las especies norteamericanas dominantes, han sido consideradas por algunos taxónomos como 4 especies diferentes y endémicas: *Pseudotsuga flahualti* Flous, *P. guinieri* Flous, *P. rehderi* Flous y *P. macrolepis* Flous (Flous *vide* Martínez, 1953; Martínez, 1953; Espinosa, 1979; Acosta-Pérez, 1992).

Sin embargo, aún se mantienen muchas controversias sobre la ubicación taxonómica de los árboles pertenecientes a este género. Las descripciones varían en cuanto al número de especies desde 22 y 3 variedades según Flous y sus seguidores (Martínez, 1953), a 4 especies y sus variedades según el criterio más conservador de Farjon (1998): para Norteamérica, *P. macrocarpa* (Torr.) Mayr y *P. menziesii* (Mirb) Franco, con sus dos variedades, *P. menziesii* var. *menziesii* y *P. menziesii* var. *glauca*; para Asia, *P. japónica* (Shiras.) Beissn y *P. sinensis* Dode con las variedades *P. sinensis* var. *sinensis* y *P. sinensis* var. *brevifolia*. Existe una tendencia a considerar a las especies mexicanas como variedades ecotípicas de *P. menziesii* var. *glauca*. Cabe señalar, que en general se requiere la realización de estudios más amplios de las especies descritas en México, sobretudoo de las poblaciones más sureñas; ya que a diferencia de lo que ocurre con las poblaciones de EUA y Canadá, hay pocos trabajos que abarquen la situación ecológica, fisiológica y genética de las poblaciones locales. Además sería importante que se evalúe su relación con las poblaciones del norte, así como la posibilidad que se hayan presentado eventos de

especiación en México, como fue mostrado para algunas poblaciones de *P. flahualti* a través de análisis aloenzimáticos presentados por Li y Adams (1989). Finalmente, este tipo de trabajos serían de gran utilidad para el planteamiento de estrategias de manejo y conservación que protejan el potencial evolutivo de esta especie (El-Kassaby y Ritland, 1996). En este trabajo, se consideró el criterio de Martínez (1953), retomado por Acosta-Pérez (1992), donde se considera a *P. macrolepis* como una especie definida .

### *Pseudotsuga macrolepis* Flous



Fig. 1. *Pseudotsuga macrolepis* Flous., Terrenate, Tlaxcala, México.

verde con la cara inferior de color amarillento-glauco. Los estróbilos son ovoides, de 5.5 a 8 cm de largo y de 3.5 a 4 cm de ancho, de color café oscuro-rojizo. Las semillas son subtriangulares de 5 a 7 mm de largo por 3.5 mm de ancho, planas, de color café y con un ala de 15 a 16 mm de longitud (incluyendo a la semilla) (Martínez, 1953). Los embriones presentan de 5 a 9 cotiledones, aunque con frecuencia promedian 6 (Mápula *et al.*, 1996).

**Distribución.** *P. macrolepis* presenta la distribución más austral en lo que se refiere a los árboles de este género. Usualmente se encuentran en zonas húmedas y sombrías, en

laderas de cañadas o barrancas con exposición norte o en valles muy protegidos, entre los 1500 y los 3700 msnm. Ocupan superficies de extensiones muy reducidas y discontinuas en medio de otros tipos de vegetación, típicamente del género *Pinus* o *Abies*, a lo largo de la Sierra Madre Occidental, desde Sonora y Chihuahua hasta Zacatecas; en diferentes localidades montañosas de Coahuila y Nuevo León; en la parte más alta de la Sierra de Pachuca, Hidalgo; en la región de Huayacotla Veracruz; en una pequeña área al centro de Puebla; así como en Peña Prieta y Rosa Blanca en las montañas de San Felipe en Oaxaca (Espinosa, 1979; Debreczy y Rácz, 1995; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). En Tlaxcala, se han encontrado en las regiones boscosas de los Municipios de Tlaxco, Terrenate, Altzayanca y Emiliano Zapata (Acosta-Pérez, 1992; Mojarás-González, 2001).

Usos. El potencial maderero de *P. macrolepis* se basa en la calidad de su madera que es similar a la de *P. menziesii*, una de las especies maderables más importantes y valiosas a nivel comercial. Por su alta productividad, la calidad de su madera, la forma del árbol y su tasa de crecimiento, ha sido ampliamente utilizado como "árbol de Navidad", así como para la construcción, especialmente de edificios, para la fabricación de vigas, novopán, traves, pisos, durmientes, etc.; mientras que la pulpa se ha empleado para la fabricación de papel (Aboel-Nil, 1987; Goldfarb y Zaerr, 1989; El-Kassaby y Ritland, 1996).

Debido a lo fragmentado de su distribución, a lo reducido de sus poblaciones así como al desconocimiento general de su ecología y potencial productivo, *P. macrolepis* ha pasado prácticamente desapercibida en México como especie maderable (Pérez-Sánchez, 1996). En Tlaxcala, ha sido utilizada principalmente para construcciones rurales (Acosta-Pérez, 1992), mientras que México importa anualmente árboles de este género para su venta en navidad (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

Problemática. Es bien conocido que los bosques están siendo explotados a una tasa mayor de la que son capaces de regenerarse ya sea de manera natural o a través de reforestaciones; esta tendencia pone en riesgo la existencia de una gran cantidad de especies, así como la posibilidad de aprovechar estos recursos en el futuro (Thorpe y Harry, 1991). En México, las poblaciones del género *Pseudotsuga* permanecen como un relicto de una antigua distribución mucho más amplia de árboles de este género (Farjon,

1990; Debreczy y Rácz, 1995; Anónimo, 2001). Sin embargo, debido a las diversas actividades del hombre, en particular a la apertura de terreno boscoso para la agricultura y ganadería, a la tala inmoderada y al sobrepastoreo a que es sometido el sotobosque, aunado a problemas provocados por los incendios forestales y el ataque de plagas a semillas y estróbilos, se ha reducido la ya limitada superficie que ocupaban los rodales de este árbol, lo cual se ha traducido a que en muchas regiones del país se presenten ya problemas para su conservación (Domínguez-Álvarez, 1994; Pérez-Sánchez, 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

En el norte del país la regeneración natural de árboles de este género parece ser abundante, sin embargo, lo limitado de su distribución indica que se requieren estudios y medidas que permitan un aprovechamiento racional que garanticen su conservación y protección (Domínguez-Álvarez, 1994; Anónimo, 2001). Con respecto a *P. macrolepis*, los problemas de conservación se agudizan en la frontera sur de su distribución, particularmente en Hidalgo y Tlaxcala, debido a su baja regeneración natural. Al parecer, esta situación resulta de la baja producción de semillas viables tanto por el ataque de plagas a los estróbilos, como por el alto porcentaje de semillas vanas y a los reducidos índices de germinación. Lo anterior podría indicar que esta especie presenta problemas de infertilidad y de autopolinización como consecuencia del bajo número de individuos en las poblaciones (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). En estudios donde se han evaluado el número de semillas viables producidas por distintos árboles en las poblaciones de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, así como en Tlaxco y Terrenate, Tlaxcala, se demostró que las semillas disponibles para la regeneración en cada una de ellas correspondía al 25%, 11.64% y 45.82% respectivamente (Pérez-Sánchez, 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Estos datos son considerablemente bajos si se compara con lo que se ha encontrado para semillas de *P. menziesii* obtenidas de las poblaciones provenientes de del Valle de Willamette, Oregon, EUA, donde el 98% de la semilla se encontró sana, es decir disponible para la germinación (Lavender, 1958).



La reforestación con especies de *Pseudotsuga* se ha realizado tradicionalmente a través del uso de semillas debido a que las especies de este género no se reproducen vegetativamente de manera natural. Sin embargo, la producción de semilla es variable y su calidad depende del estado fisiológico de la planta madre; por lo regular *P. macrolepis*, al igual que muchas coníferas, presenta cierta periodicidad cíclica en la producción, donde un año de cosecha abundante es seguido por un periodo de baja productividad que puede variar entre los dos y siete años (Allen y Owens, 1972 *vide* Pérez-Sánchez, 1996). Esta irregularidad natural en la producción de semillas aunado a los bajos porcentajes de viabilidad y germinación de semillas de las poblaciones nativas, complica los esfuerzos de propagación y plantea la necesidad de buscar alternativas para su regeneración.

La regeneración de especies forestales mediante propagación vegetativa se ha realizado tradicionalmente mediante el enraizamiento de estacas o de acículas, así como a través del empleo de injertos; sin embargo, la mayoría de las coníferas no se prestan a este tipo de manejos (Thorpe y Harry, 1991). En el caso de árboles de *Pseudotsuga*, el enraizamiento de estacas ha tenido un éxito limitado por la tendencia de éstas a crecer plagiotrópicamente por periodos en ocasiones prolongados, antes de que se establezca un crecimiento normal, lo cual minimiza el valor de los propágulos. Además se ha demostrado que la capacidad de enraizamiento de las estacas disminuye al aumentar la edad de la planta madre, con lo cual se limita la posibilidad de propagar árboles con características deseadas ya que éstas se expresan principalmente en la madurez (AboEl-Nil, 1987; Hermann y Lavender, 1990).

Ante esta situación, la propagación vegetativa por medio del cultivo de tejidos vegetales se presenta como una herramienta muy útil para obtener la regeneración de *P. macrolepis*, la cual en combinación con las rutas clásicas de propagación y la implementación de estrategias para su conservación, protección y manejo podría auxiliar en la recuperación de las poblaciones de esta especie.

## ASPECTOS GENERALES SOBRE LA MICROPROPAGACIÓN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se refiere a hacer crecer células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre, sobre un medio artificial, bajo condiciones de asepsia y de ambiente controladas, es decir, *in vitro* (George, 1993). Se basa en el principio de la totipotencialidad celular, la cual propone que todas las células nucleadas, aún aquellas que están completamente diferenciadas, contienen toda la información genética de una planta y por lo tanto son capaces de regenerar un individuo completo si las condiciones son adecuadas (Westhoff *et al.*, 1998). Esta técnica se ha empleado tanto en la investigación básica como aplicada con el objeto de estudiar diversos aspectos como: el comportamiento celular, el desarrollo y la transformación de plantas, la producción de plantas libres de patógenos y almacenamiento de germoplasma, la propagación clonal y para la producción de metabolitos secundarios (Gaspar *et al.*, 1996).

La propagación de plantas a través del CTV se conoce como propagación clonal o micropropagación ya que plantea la regeneración de un número indeterminado de plántulas genéticamente idénticas, a partir de una porción muy pequeña (inóculo o explante) de una planta madre (Hartman, 1987; George, 1993). Por ello, esta técnica tiene un gran potencial como herramienta para la regeneración de individuos de genotipos élite así como de especies raras o amenazadas (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe y Harry, 1991).

Otras ventajas que proporciona la micropropagación sobre las técnicas convencionales de propagación vegetativa son: (1) permite propagar especies que por su edad no pueden producirse por medio de otras técnicas; (2) permite la regeneración de un número alto de plantas en un período de tiempo relativamente corto; (3) permite el manejo necesario para el mejoramiento genético de especies; (4) se logra la reducción de los ciclos de vida de las especies forestales (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe y Harry, 1991; Thorpe *et al.*, 1991).

Sin embargo, para el caso de las especies forestales, muchas de estas promesas permanecen sin cumplirse debido principalmente a las dificultades inherentes al cultivo que se enfrentan durante el establecimiento de un sistema de propagación, como la oxidación y la contaminación de los explantes, al intenso trabajo que implica, así como a

los altos costos de producción. Por ello, la micropropagación en este tipo de especies se mantiene aún a nivel de investigación experimental, a la zaga de especies importantes en la horticultura y ornamentales (Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

La regeneración *in vitro* de plantas se ha logrado mediante tres rutas: (1) a partir de meristemas ya existentes, por el desarrollo de yemas axilares; (2) por formación de órganos adventicios (brotes o raíces); y (3) por embriogénesis somática (von Arnold, 1988; Thorpe y Harry, 1991; Thorpe *et al.*, 1991; Gamborg y Phillips, 1995). Las primeras dos rutas se describen como formas de organogénesis, donde usualmente se forman brotes unipolares que deben ser enraizados posteriormente; mientras que la embriogénesis somática requiere que el tejido somático recapitule los pasos del desarrollo embrionario y origine un embrión bipolar, aunque en un ambiente y bajo circunstancias muy distintas al del embrión cigótico (Thorpe y Harry, 1991; Howell, 1997). Para el caso de las coníferas, la organogénesis es la ruta más empleada para la regeneración (Thorpe *et al.*, 1991).

La formación de plántulas vía organogénesis es un proceso que involucra al menos 4 fases distintivas: (1) establecimiento del cultivo e inducción de yemas; (2) desarrollo y multiplicación de yemas y brotes; (3) enraizamiento de los brotes obtenidos; y (4) aclimatización y transferencia al suelo (Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Ahuja, 1993). Debido a que el presente trabajo se enfoca sobre la ontogenia de los brotes adventicios, a continuación se consideran en mayor detalle algunos de los factores que influyen sobre las primeras dos fases del proceso de regeneración.

#### *Establecimiento del cultivo e inducción y desarrollo de brotes.*

La morfogénesis *in vitro* resulta de la interacción de tres factores principales: el material vegetal o explante, el medio de cultivo y las condiciones ambientales. Aunque los principios básicos para inducir la formación y el desarrollo de los brotes adventicios ya han sido bien establecidos, las condiciones óptimas de regeneración necesitan ser determinados de manera empírica para cada especie, (Thorpe y Harry, 1991; Piqueras y Debergh, 1999). En las coníferas, generalmente se ha obtenido la formación de brotes

adventicios directamente del tejido (organogénesis directa) sin pasar primero por una fase de callo (organogénesis indirecta), utilizando material juvenil, principalmente embriones en diferentes estados de maduración, cotiledones y secciones de epicotilo, así como a partir de yemas laterales de árboles jóvenes y maduros (von Arnold, 1988; Thorpe y Harry, 1991); sin embargo hay que señalar que la regeneración a partir de material maduro, como acículas, se ha limitado a muy pocas especies, entre las que destacan *P. menziesii*, *Pinus Lambertiana* (Gupta y Durzan, 1985), *Sequoia sempervirens* y *Pinus pinaster* (von Arnold, 1988), o a partir de meristemos apicales como en *Pinus pinaster* (Dumas y Monteouis, 1995). Es decir, el genotipo, el estado fisiológico así como la edad ontogénica de la planta madre y del explante, juegan un papel muy importante para la *competencia* morfogénica del tejido (Piqueras y Debergh, 1999).

Por su parte, inducir la *redeterminación* de las células de un explante hacia un tipo de desarrollo y su *expresión*, están fuertemente ligadas a la manipulación de las condiciones de cultivo, tanto nutrimentales como ambientales, pero especialmente de reguladores de crecimiento. Se han formulado diversos medios de cultivo para la formación de brotes, los cuales varían en las concentraciones de sales minerales, especialmente en su fuente de nitrógeno, ya que se sabe que las concentraciones de los minerales afectan la capacidad morfogénica del explante, el aprovechamiento de otros componentes y la morfología de las estructuras. Los medios contienen además una fuente de carbono (usualmente sacarosa), vitaminas, nitrógeno reducido (aminoácidos) y en ocasiones una serie de compuestos complejos (extractos de levadura, agua de coco, etc.) (Piqueras y Debergh, 1999).

El papel del ambiente de cultivo sobre la morfogénesis ha sido menos estudiado, sin embargo, algunos de los factores que se sabe lo afectan son: (a) la forma física del medio, ya sea líquido o sólido y en éste último, afecta también las características químicas del agente gelificante y la concentración utilizada ya que esto influye sobre la disponibilidad de agua, nutrimentos y reguladores de crecimiento (Bornman y Vogelmann, 1984); (b) el pH, que se ajusta usualmente entre 5.6 y 5.8; (c) el ambiente gaseoso (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994); (d) la luz (calidad, intensidad y fotoperíodo); y (f) la temperatura. Cabe señalar que las condiciones óptimas para el desarrollo de estructuras varían

dependiendo de la especie con la cual se esté trabajando, de las características del cultivo que se desea obtener y de una fase del cultivo a otra (von Arnold, 1988; Thorpe y Harry, 1991; Piqueras y Debergh, 1999).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel determinante en la morfogénesis *in vitro* y su efecto corresponde quizás a uno de los fenómenos mejor documentados, pero menos comprendidos dentro de este tipo de trabajos. En general, los reguladores empleados con mayor frecuencia para la micropropagación son las citocininas y las auxinas, aunque se sabe que el etileno, el ácido absísico (ABA), las giberelinas y las poliaminas, entre otros, también ejercen una actividad regulatoria y se han empleado en los cultivos (Gaspar *et al.*, 1996).

Las citocininas se han utilizado ampliamente en los cultivos debido a que estimula la división celular e induce la formación de brotes adventicios (Gaspar *et al.*, 1996). En coníferas, la inducción de meristemoides que posteriormente se desarrollen en brotes adventicios, requiere obligadamente de la aplicación de citocininas, ya sea sola o en combinación con auxinas, en concentraciones que varían entre 0.5-30  $\mu\text{M}$ , cuando éstas son incluidas en el medio, o de 50-500  $\mu\text{M}$  cuando son empleadas como pulsos (von Arnold, 1988).

Aunque en la naturaleza se conocen al menos 25 tipos de citocininas (George, 1993), la citocinina utilizada con mayor frecuencia en los cultivos de coníferas es la N<sup>6</sup>-Benciladenina (BA), aunque la kinetina (K), la 2-isopentiladenina (2-iP) y la zeatina (Z), o combinaciones de ellas, han sido empleadas también con éxito. Cabe señalar que aunque estos compuestos pertenecen a un mismo grupo de reguladores de crecimiento, su efecto en cultivo y las concentraciones en las cuales inducen una caulogénesis óptima, es distinta y parece estar muy relacionada al genotipo del explante (Sul y Korban, 1994), por lo cual se sugiere que los explantes varían en su sensibilidad a uno u otro tipo.

Por ejemplo, Flinn *et al.* (1986) encontraron que en cultivos de *Pinus strobus*, tanto el 2-iP como la BA, eran igualmente efectivas para inducir la formación de brotes adventicios en sus respectivas concentraciones óptimas, las cuales al compararse, variaban

considerablemente, siendo de 10 mg/l para 2-iP y de 0.5 mg/l para BA. Así mismo, diversos autores, al igual que López-Escamilla (2000) para *Picea chihuahuana*, han encontrado que la BA induce un desarrollo retardado de brotes aunque éstos se forman en un mayor número. Lu *et al.* (1991) para *Picea rubens*, Harry y Thorpe (1994) para *Pinus banksiana*, Sen *et al.*, (1994) para *Pinus eldarica*, Martínez-Pulido *et al.*, (1994) para *Pinus canariensis*, así como Kolevska-Pleitikapic´ y Buturovic´-Deric´(1995) en cultivos de *Picea omorika*, encontraron algo similar, aunque recomendaron el empleo de combinaciones de BA con K o Z para la obtención de brotes más vigorosos. Sin embargo, a diferencia de los autores mencionados con anterioridad, Sul y Korban (1994) en cultivos de *Sequoia sempervirens* encontraron que la citocinina más efectiva para inducir la formación de brotes era la Z.

Por su parte, las auxinas influyen sobre muchas actividades, entre las que destacan la expansión celular, la acidificación de la pared celular, el inicio de la mitosis (al afectar la replicación del DNA) y la organización de los meristemas, para dar lugar ya sea a tejido desorganizado (callo) o a órganos definidos (usualmente raíces); así mismo, promueve la diferenciación vascular y el mantenimiento de la dominancia apical (Gaspar *et al.*, 1996). Las auxinas empleadas con mayor frecuencia son el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En general, se considera que las auxinas inhiben la formación de brotes adventicios en cultivos de coníferas, ya que tienden a inducir el desarrollo de callo, sobretudo a concentraciones más altas; sin embargo, en algunas especies como *Pinus eldarica* (Sen *et al.*, 1992) y *P. macrolepis* (García-Campusano, 1999; Monjarás-Gonzalez, 2001) se emplearon a bajas concentraciones sin que se notara un efecto negativo.

#### MICROPROPAGACIÓN DEL GÉNERO *PSEUDOTSUGA*

La utilización de técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) para la regeneración de especies forestales se ha extendido considerablemente desde que se obtuvo la primera plántula *in vitro* de *Pinus palustris* en 1975 (Sommer *et al.*, 1975 *vide* Aitken-Christie y Thorpe, 1984; von Arnold, 1988). Desde entonces, se han logrado producir plántulas de

más de cien especies de árboles forestales, de las cuales una tercera parte son gimnospermas, con particular énfasis en especies del género *Pinus* (Thorpe *et al.*, 1991).

Sobre el género *Pseudotsuga*, se han realizado trabajos principalmente con *P. menziesii* (Mirb.) Franco (Goldfarb y Zaerr, 1989), en los cuales se han desarrollado una variedad de protocolos para su micropropagación, donde se han empleado distintos explantes y se han obtenido diferentes rutas de regeneración (Dunstan y Thorpe, 1985 *vide* Thorpe *et al.*, 1991). En el Cuadro 1 se resumen las principales técnicas propuestas para la obtención de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de embriones o cotiledones.

Cuadro 1. Resumen de las técnicas para la micropropagación vía organogénesis de *Pseudotsuga menziesii*, en los cuales se utilizaron embriones o cotiledones como explantes.

Autor	Explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Respuesta
La Rue (1935) (a)	Emb.	WH modificado	0.05 mg/l AIA	Plántulas
Cheng (1975) (b)	Emb y cot	MS modificado	1.5 µM de AIA, AIB, 2iP y BAP	Callo
	Callo	MS25%	0.5-1mM BAP	Yemas
	Yemas	MS 50%	Ninguno	Brotos
Sommer (1975) (a)	Emb	SO	0.1-4 mg/l BAP +0.01 mg/l ANA	Yemas
Chalupa (1976) (a)	Cot	LS50%	1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	Yemas
	Yemas	LS50%	ninguno	Brotos
	Brotos	LS50%	1 mg/l AIB ó polvo de auxina + perlita	Plántulas
Chalupa (1977) (a)	Emb	LS	1-2 mg/l ANA + 1 mg/l BAP	Callos, yemas y acículas
	Yemas	LS	ninguno	Brotos

*xplantes*: emb: embriones; cot: cotiledones. *Medios de cultivo*: BL: Brown y Lawrence, 1968; CH: Cheng, 1977; MS mod: Murashige y Skoog, 1962 modificado; WH mod: White, 1934 modificado; SO: Sommer, 1975; LS: Linsmaier y Skoog; WPM: Lloyd y McCown, 1981. *Fuentes*: (a) Goldfarb y Zaerr, 1981; (b) Cheng, 1977; (c) Cheng y Voqui, 1977; (d) Montes-Rivera, 1993.

**Cuadro 1 (cont.). Resumen de las técnicas para la micropropagación vía organogénesis de *Pseudotsuga menziesii*, en los cuales se utilizaron embriones o cotiledones como explantes.**

Autor	Explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Respuesta
Winton y Verhagen (1977) (a)	Emb	BL mod	0.1-0.5 mg/l BAP	Yemas
	Yemas	BL mod	Ninguno	Brotos
	Brotos	BL mod	0.1 mg/l BAP+ 5 mg/l NOAA	Callo, yemas y brotes
	Brotos	BL mod	4.1 mg/l AIB	Plántulas
Cheng (1977) (b)	Cot	CH	5 µM BAP+0.5-5.0 nM ANA	Yemas
Cheng y Voqui (1977) (c)	Cot	CH	5 µM BAP+0.5-5.0 nM ANA	Yemas
	Yemas	CH	Ninguno	Brotos
	Brotos	CH + 0.5% sacarosa		Plántulas
Chalupa (1983) (a)	Cot	MS bajo en N o WPM	1-2 mg/l BAP + 0.005 - 0.01 mg/l ANA	Yemas
	Yemas	MS bajo en N o WPM	ninguno	Brotos
	Brotos	WPM50%	2 mg/l AIB + 2 mg/l ANA, perlita	Plántulas
Montes-Rivera (1993) (d)	Emb. maduros	MS50% GD50%		Brotos Crecimiento de brotes

*Explantes:* emb: embriones; cot: cotiledones. *Medios de cultivo:* BL: Brown y Lawrence, 1968; CH: Cheng, 1977; MS mod: Murashige y Skoog, 1962 modificado; WH mod: White, 1934 modificado; SO: Sommer, 1975; LS: Linsmaier y Skoog; WPM: Lloyd y McCown, 1981. *Fuentes:* (a) Goldfarb y Zaerr, 1981; (b) Cheng, 1977; (c) Cheng y Voqui, 1977; (d) Montes-Rivera, 1993.

Para el caso de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, se realizaron tres trabajos con el objeto de producir plántulas mediante el CTV. Galindo-Flores (1996 y comunicación personal) probó el cultivo de diferentes explantes (yemas, embriones maduros y megagametofitos) de árboles de *P. macrolepis* provenientes de Tlaxco y Terrenate, Tlaxcala, en diferentes medios de cultivo (Murashige y Skoog y B5 modificado por Litz) contemplando 24 combinaciones de fitoreguladores (ANA/BA). Obtuvo la formación de brotes en el 19% de los embriones; asimismo, observó que se obtenía un mayor número de embriones con brotes en las siguientes concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA): 0.0/3.0; 0.1 /5.0 y 1.0/1.0 mg/l. Se formaron un total de 16 brotes vía organogénesis directa, susceptibles a ser enraizados, a los 75 días de cultivo. No obstante, no se obtuvo su enraizamiento.



En un estudio posterior, se realizaron 14 ensayos a lo largo de los cuales se modificó la metodología hasta entonces propuesta, con la finalidad de optimizar la formación de brotes adventicios. Se encontró que el medio Shenck y Hildebrandt y una temperatura de incubación de 22°C era lo más adecuado para inducir a formación de estas estructuras. No obstante que se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con respecto a la respuesta morfogénica, así como en el número de explantes que formaron yemas, no se observó un patrón definitivo con relación a estas diferencias. Las diferencias observadas entre tratamientos fueron principalmente de orden cualitativo; en los tratamientos sometidos a 2,4-D/K se obtuvo un desarrollo más rápido de los brotes que aquellos obtenidos con ANA/BA, aunque en éstos se formaron un mayor número de yemas (Fig. 2). Se obtuvieron primordios de raíces en tres de los brotes obtenidos, después de que fueran sometidos a un pulso de 72 horas en 10 mg/l de AIB en medio MS y subcultivados en SHI al 50% (García-Campusano, 1999).



Fig.2. Explantes cultivados durante 130 días, sometidos a tratamientos con 0/5.0 mg/l de: (A) ANA/BA; (B) 2,4-D/K. Note la diferencia entre el tamaño y el número de brotes formados. Fuente: García-Campusano, 1999.

En base a este trabajo, Monjarás-González (2001) realizó modificaciones a los tratamientos de desinfección y escarificación, así como en el cultivo de los embriones (contemplando ya únicamente 6 tratamientos de ANA/BA y 2,4-D/K) con los cuales se obtuvo la formación de brotes en el 51.54% de los embriones tratados. Al igual que en el trabajo anterior tampoco se observaron grandes diferencias estadísticas, aunque la concentración de 0.1/3.0 mg/l de ambas combinaciones de reguladores resultó favorable de manera

consistente en los 6 ensayos evaluados. Cabe señalar, que en este trabajo también se hace mención de las diferencias cualitativas observadas entre los embriones cultivados con ANA/BA y 2,4-D/K. Para la inducción de raíces se usaron 23 tratamientos contemplando diferentes concentraciones y tipos de auxinas, así como una cepa de hongo micorrizógeno; se obtuvo la formación de primordios radiculares en 3 de los brotes sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de ANA.

A pesar de que se ha logrado establecer un protocolo que permite la obtención de brotes adventicios vía organogénesis directa, la baja respuesta morfogenética y la falta de enraizamiento impiden la aplicación de estas técnicas para la regeneración a gran escala de este árbol. Por ello, conocer los eventos celulares que culminan en la formación de estos brotes puede resultar de gran utilidad para conocer los efectos que tienen las condiciones de cultivo, en particular el tipo de regulador de crecimiento, sobre la morfogénesis *in vitro*.

#### ONTOGENIA DE BROTES ADVENTICIOS OBTENIDOS *IN VITRO*

La formación de estructuras diferenciadas durante el cultivo *in vitro*, como brotes, raíces o embriones, se considera como un proceso complejo en el cual intervienen una variedad de factores tanto intrínsecos como extrínsecos (Joy Iv y Thorpe, 1999). Resulta de la interacción de eventos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos que culminan en o son producto de cambios en la expresión génica y que se presentan como una respuesta a la manipulación de las condiciones externas, especialmente de reguladores de crecimiento, a los cuales son expuestos los explantes durante el cultivo. A través de estas interacciones, células meristemáticas o parenquimatosas se especializan durante etapas sucesivas de desarrollo, para dar lugar a células y tejidos particulares que se encuentran integradas en sus actividades, como órganos o embriones (morfogénesis) (Hicks, 1980; Patel y Berlyn, 1983; Hanke y Green, 1994; Joy Iv y Thorpe, 1999; Ziv, 1999). El cultivo de tejidos ha resultado ser una herramienta importante para estudiar los procesos de morfogénesis en

las plantas en general, aunque su enfoque ha sido principalmente la de comprender y optimizar el sistema de producción de plántulas.

Si bien existen más de cien protocolos que describen la regeneración de especies forestales mediante estas técnicas (Thorpe *et al.*, 1991), el número de trabajos que intentan describir los procesos morfogénéticos ya sea a nivel estructural, fisiológico, bioquímico o molecular son mucho menores (Cuadro 2), siendo *Pinus radiata* la especie más ampliamente estudiada (Thorpe y Kumar, 1993; Joy Iv y Thorpe, 1999). A través de éstos trabajos y los realizados en otras especies, como *Nicotiana tabacum* (Joy Iv y Thorpe, 1999), se ha logrado establecer que la formación de estructuras durante el cultivo *in vitro* se puede dividir en tres fases generales (Thorpe y Kumar, 1993):

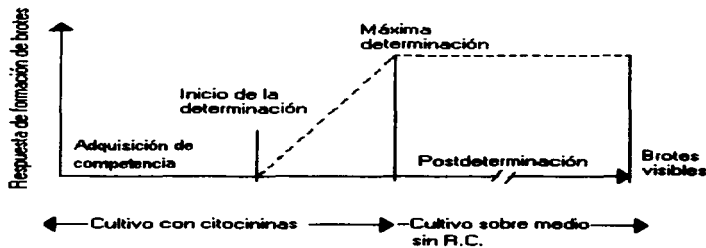
1) La obtención de *competencia* o fase de pre-inducción, durante la cual las células somáticas se desdiferencian, retomando un estado meristemático o basal; es decir, la célula adquiere un estado en el cual puede expresar su totipotencialidad (Lyndon, 1990). En la micropropagación, la competencia se refiere a la capacidad que tienen las células para responder organogénicamente a un estímulo inductor (Christianson y Warwick, 1985 *vide* Ellis y Bilderback, 1989). Se presenta usualmente como resultado del aislamiento, de lesiones o a través del establecimiento de nuevos gradientes a través del tejido (Ziv, 1999);

2) La fase de inducción o *determinación*, en la cual, a través de la manipulación de las condiciones de cultivo, se compromete a las células competentes a seguir una ruta de diferenciación particular, en este caso, organogénica o embriogénica, que persiste (o se expresa) aún en ausencia de las condiciones que lo indujeron inicialmente. Es decir, el concepto de determinación es relativo ya que depende tanto de las condiciones experimentales como de las propiedades del explante; a su vez, la determinación implica cambios estables en el fenotipo que permanecen aún en ausencia de estímulos externos. En general, se considera que el éxito en la regeneración de plantas completas depende de la posibilidad de manejar esta fase (Meins, 1986; Lyndon, 1990);

3) La fase de expresión, donde se presenta la morfogénesis. Esto se lleva a cabo generalmente en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos, o con tipos y concentraciones distintas a las requeridas por la fase de inducción.

Se desconocen muchos de los mecanismos estructurales, bioquímicos y moleculares que llevan al establecimiento de la competencia y la determinación celular (Westhoff *et al.*, 1998); de hecho, sólo una pequeña parte de la población de células en un explante responde morfogénicamente. Al respecto, Meins *et al.*, (1982 *vide* Meins, 1986), estimó a partir de cultivos de tejidos de tabaco, con base en el número de órganos formados, que el número de células competentes en un explante varía entre  $10^3$  -  $10^4$ . El establecimiento de la competencia celular durante el cultivo es un proceso que ocurre muy temprano y al parecer, depende fuertemente del estado fisiológico del explante. Al respecto, Ellis y Bilderback (1989) encontraron en cultivos de embriones de *Pinus ponderosa*, que existe un plazo reducido de tiempo al inicio del mismo (las primeras 48 horas) en el cual las células tienen la capacidad de responder al tratamiento inductor formando brotes, después del cual se reduce o inhibe la capacidad organogénica; lo cual parece ser común a los cultivos de coníferas ya que ha sido reportado también para *Pinus radiata* (Biondi y Thorpe, 1982) y *Picea abies* (von Arnold y Eriksson 1985 *vide* Thorpe y Kumar, 1993). Este período, si bien resulta variable de una especie a otra, se relaciona en la práctica con el tiempo óptimo de exposición a reguladores de crecimiento para comprometerlas hacia la organogénesis (Fig.3).

Fig.3. Representación esquemática de las fases de desarrollo que culminan en la formación de estructuras (Flinn *et al.*, 1988)



**Cuadro 2. Estudios histológicos sobre ontogenia y desarrollo *in vitro* de brotes adventicios en coníferas.**

Autores	Especie	Tipo de explante	Regulador de crecimiento	Origen de estructuras	Fases de desarrollo descritas	Días de cultivo
Cheah y Cheng (1978)	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Cotiledones (2-4 semanas de germinación)	5 µM BAP + 5 nM ANA	Hipodermis	*Activación de división celular *Meristemoides *Yemas *Brote adventicio	4 12 12-21 21
				Mesófilo	*Callo	4-10
Yeung <i>et al.</i> (1981)	<i>Pinus radiata</i>	Cotiledones (5-7 días)	22 µM BAP	Epidermis y subepidermis en contacto con el medio	*Activación de división celular *Estrato meristemático *Meristemoides *Meristemo apical *Brote adventicio	1-3 6 12 18 40
Jansson y Bornman (1981)	<i>Picea abies</i>	Acículas 3-5 mm 10 mm 15 mm	5 µM BAP + 5 nM ANA	Epi y subepidermis Epi dermis e hipodermis	*Meristemoides *Primordios de Brote *Brotes adventicios	— 14 90
Aitken-Christie y Thorpe (1982)	<i>Pinus radiata</i>	Acículas Días de germinación: 1 2-3 5		Epidermis (complejo estomatal inmaduro)	*Estratos de células meristemáticas	—
Kirby y Schalk (1982)	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Cotiledones (4-5 semanas)	5 µM BAP + 5 nM ANA	Hipodermis y mesófilo	*Ruptura de epidermis *Meristemoides *Primordios de brotes *Yemas *Brote adventicio	7 14 21 28 35
Villalobos <i>et al.</i> (1985)	<i>Pinus radiata</i>	Cotiledones	25 µM BAP	Epidermis y subepidermis en contacto con el medio	*Promeristemoides *Meristemoides *Yemas	3 10 21
Rumary <i>et al.</i> (1985)	<i>Picea glauca</i> y <i>Picea mariana</i>	Epicotilo	5 µM BAP + 5 µM 2iP	Regiones intercotiledonarias  Subepidermis	*Promeristemoides *Meristemoides *Primordios de brotes *Yemas  *estructuras secundarias	2-3 8 15 25  30 en adelante
Von Arnold y Grönroos (1986)	<i>Picea abies</i>	Embriones maduros	250 µM BA/ 2h	Epidermis y subepidermis en contacto con el medio	*Zonas meristemáticas *Centros meristemáticos *Primordios de brotes	6-9 12 —

**Cuadro 2 (Cont). Estudios histológicos sobre ontogenia y desarrollo *in vitro* de brotes adventicios en coníferas.**

Autores	Especie	Tipo de explante	Regulador de crecimiento	Origen de estructuras	Fases de desarrollo descritas	Días de cultivo
Wagley <i>et al.</i> (1987)	<i>Pinus eldarica</i>	Callo (6-36 meses)	1-2 mg/l K + 0.5 mg/l AIB	Superficiales	*Divisiones localizadas *formación de estratos dérmicos *Meristemo apical *Organización de haces vasculares	—
Flinn <i>et al.</i> (1988)	<i>Pinus strobus</i>	Cotiledones	1 mg/l BAP	Epidermis y subepidermis Subepidermis	*Divisiones celulares *Promeristemoides *Meristemoides *Meristemos apicales	3 4-7 14 21
Von Arnold y Hawes (1989)	<i>Picea abies</i>	Embriones maduros	250 µM BA/ 2h	Epidermis y subepidermis que rodean a los complejos estomatales	*Proliferación de células *Meristemoides *Catafilas *Meristemos apicales *Brotes adventicios	1-7 7-14 21 28-56
Saravitz <i>et al.</i> (1993, <i>vide</i> Kulchetscki <i>et al.</i> (1995))	<i>Abies fraserii</i>	Embriones maduros		Epidermis, subepidermis cotiledones	*Promeristemoides	3
				Hipocotilo	* Promeristemoides *Meristemos apicales *Brotes adventicios	3 —
Nour <i>et al.</i> (1993)	<i>Thuja occidentalis</i>	Embriones maduros	1 µM BAP	Meristemo apical	*Divisiones en el MA *Diferenciación de regiones periféricas del MA	3-5 6-7
		Brotes		Meristemos axilares	*Formación de 2 brotes *Desarrollo de brotes	12 14
Kulchetscki <i>et al.</i> (1995)	<i>Abies amabilis</i>	Cotiledones (5 días)	10 µM BAP (7d) + 10 µM BAP + 10 µM Z	Epidermis y subepidermis en contacto con el medio	*Divisiones celulares *Promeristemoides *Zonas meristemáticas *Meristemoides *Brotes adventicios	3-4 5 12 18 24
Pelletier y Laliberté (2000)	<i>Pinus banksiana</i>	Embriones maduros	6 µM BAP	Regiones intercotiledonarias, hipocotilo y cotiledones cerca o lejos del medio según la posición del embrión.	*Crecimiento del explante *Actividad organogénica *Primordios de hojas y meristemos apicales	1-7 9 14-16
López-Escamilla <i>et al.</i> (2000)	<i>Picea chihuahuana</i>	Embriones maduros	3 y 5 mg/l BAP o K	Subepidermis de cotiledones	*Promeristemoides *Meristemos apicales	14-17 24-30

Por lo regular, no ha sido posible describir morfológicamente la adquisición de competencia y determinación; aunque se han descrito una serie de estructuras que aparecen de manera gradual en el tejido, que se han relacionado a la organogénesis *de*

*novo*. Respecto a esto, la mayoría de los autores (Cuadro 2) coinciden en que el proceso organogénico se inicia con la activación de una sola célula, epidérmica o subepidérmica, la cual se divide para dar lugar a *promeristemoides*, *meristemoides* y *primordios*, a cuya estructura se van incorporando células circundantes.

Los *promeristemoides* aparecen entre los 2 y 7 días de cultivo y se han descrito como estructuras organizadas de 6-8 células, originadas a partir de divisiones periclinales y luego anticlinales de una sola célula inicial. Las células que conforman esta estructura presentan núcleos grandes y citoplasma denso, paredes muy delgadas entre sí, con pocos o sin espacios intercelulares y abundantes conexiones vía plasmodesmos (Villalobos *et al.*, 1985). A nivel citoquímico, Patel y Berlín (1983) con *Pinus coulteri* y Flinn *et al.* (1989) con *Pinus strobus*, relacionaron la acumulación de lípidos, o una degradación más lenta de éstos, con los sitios de formación de agrupaciones celulares y *promeristemoides*; así mismo se observó la rápida disminución de las proteínas de almacenamiento, aunque este proceso usualmente se inició con un retraso con respecto al tejido del explante que no respondió formando estas estructuras. Aunque los *promeristemoides* no han sido descritos en todos los sistemas, han sido considerados como precursores de los *meristemoides*; mientras que Flinn *et al.* (1988) en su sistema de cultivo de cotiledones de *Pinus strobus*, relacionó la presencia de estas estructuras con la competencia del explante para formar brotes adventicios; aunque en la mayoría de los sistemas estudiados esto no se ha podido correlacionar.

Por su parte, los *meristemoides*, nódulos o centros *meristemáticos*, se han reportado a partir de los 10 días de cultivo, usualmente en los estratos epidérmicos y subepidérmicos de la superficie del explante en contacto con el medio (Cuadro 2). Se les considera un sitio de crecimiento activo, de tejido indiferenciado, a partir del cual se generan nuevas células o estructuras adventicias (von Arnold, 1988). Son masas esféricas de pequeñas células isodiamétricas, del tipo *meristemático*, con citoplasma denso, vacuolas pequeñas y en general tienen un mayor contenido de organelos, así como un núcleo prominente con una mayor cantidad de material nuclear (George, 1993).

Según los estudios citoquímicos realizados a partir de cultivos de cotiledones, Yeung *et al.* (1981) y Biondi y Thorpe (1982) para *Pinus radiata*, Patel y Berlín (1983) para *Pinus coulteri* y Flinn *et al.* (1989) para *Pinus strobus*, encontraron que la acumulación de lípidos que se evidenció durante la etapa de promeristemoide disminuye de manera notoria al formarse los meristemoides y durante la formación de los brotes, lo cual concuerda con el incremento en la actividad de lipasas. Se cree que este cambio en el metabolismo de los lípidos puede ser un indicador de un cambio en la determinación de las células hacia a la organogénesis, ya que es muy posible que sea el metabolismo de los lípidos el que esté implicado en producción de la energía necesaria para este proceso, al menos en coníferas (Thorpe, 1982).

Por otra parte, el papel que tiene el almidón sobre la morfogénesis aún no se ha resuelto. De acuerdo a los trabajos realizados por Thorpe y Murashige (1970) en callos de tabaco y aquellos realizados por Patel y Thorpe (1984) en *Pinus radiata* y Patel y Berlín (1983) en *Pinus coulteri*, se relacionó la acumulación de almidones en las capas epidérmicas y subepidérmicas de los explantes con las etapas iniciales de la morfogénesis, el cual era utilizado como fuente primaria de energía para el desarrollo de meristemoides y brotes; sin embargo en los estudios realizados por Biondi y Thorpe (1982) para *Pinus radiata*, por von Arnold y Hawes (1989) para *Picea abies* y por Flinn *et al.* (1989) para *Pinus strobus*, el efecto de los almidones sobre la morfogénesis no logró demostrarse y de hecho, no pareció necesaria su presencia para que se presentara la organogénesis.

Aunque el concepto del meristemoide ha sido ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo de brotes y raíces adventicias, la etapa en la cual células meristemáticas llegan a constituir un meristemoide y el tamaño que éste llega a tener, nunca ha sido definido con claridad. Se considera que inicialmente son apolares y se ha planteado la posibilidad de que constituyen centros de actividad meristemática relativamente indeterminados (es decir, que pueden originar tanto brotes o raíces), aunque esto no se ha demostrado en todos los casos (Hicks, 1980; George, 1993). Regularmente, poco después de su formación,



muestran una actividad direccional y divisional que lleva a la formación de un primordio unipolar (Joy-Iv y Thorpe, 1999).

Otro tipo de arreglo celular que ha sido descrito durante la organogénesis es la formación de zonas meristemáticas. von Arnold y Grönroos (1986) durante el cultivo de embriones de *Picea abies*, las describen como estratos de células meristemáticas de la epidermis y subepidermis, que se forman a partir de los 9 días de cultivo a lo largo del embrión o en las porciones de éste que se encuentran en contacto directo con el medio. Yeung et al. (1981) y Villalobos *et al.* (1984) mencionaron este tipo de organización celular en cultivos de cotiledones de *Pinus radiata*. En general, a medida que progresa el cultivo, la actividad meristemática de las células se detiene y éstas se vuelven vacuoladas, mientras que muchas acumulan taninos, exceptuando unas pocas a partir de las cuales se inician los meristemoides y posteriormente las yemas.

Finalmente, la yema apical presenta una estructura típica, conformada por el meristemo apical y los primordios foliares. De acuerdo a Steeves y Sussex (1989) y con base en las descripciones del meristemo apical de *Ginkgo biloba*, en las gimnospermas el meristemo apical tiene la forma característica de un domo, sin una zonación aparente, aunque una Organización radial que se centra alrededor de unas células de mayor tamaño denominadas "células madre centrales". A diferencia de lo observado para el modelo de "túnica -corpus", las células de la capa superficial que pueden presentar divisiones tanto anticlinales como periclinales u oblicuas; mientras que los primordios foliares se originan a partir de divisiones periclinales del estrato exterior de la zona periférica que rodea, bajo la superficie, a las células madre centrales.

Si bien el patrón de desarrollo de los brotes adventicios en los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* parecen ser similares, su estudio a un nivel histológico e histoquímico resulta de gran utilidad ya que permite comprender mejor el proceso productivo así como visualizar sus limitaciones. Además, permite complementar el conocimiento ya existente acerca de la morfogénesis *in vitro*, lo cual puede servir de base para la aplicación de otras

herramientas de estudio (bioquímicas y moleculares) que permitan una mayor comprensión de como ocurren estos procesos en la naturaleza.

En la gran mayoría de los trabajos histológicos que se han realizado, se ha obtenido un seguimiento de los patrones de división y diferenciación celular, así como cambios metabólicos que se han relacionado con la formación de los brotes adventicios, en los explantes que han sido sometidos a tratamientos con distintos tipos, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, especialmente citocininas (Patel y Berlín, 1983; Patel y Thorpe, 1984; Flinn *et al.*, 1986 y 1989). Asimismo, se han analizado las diferencias en la organización del tejido como respuesta a tratamientos inductores de brotes y en aquellos donde se induce callo (Cheah y Cheng, 1978) y el papel de los gradientes formados en el tejido como consecuencia de su posición sobre el medio (Yeung *et al.*, 1981; Pelletier y Laliberté, 2000) y tiempo de exposición (von Arnold y Grönroos, 1986). Existe, a su vez, diversos de trabajos que comparan el efecto de diversas citocininas (López-Escamilla *et al.*, 2000, ) y otros reguladores de crecimiento en el número de estructuras inducidas. Sin embargo, existe un número considerablemente menor de trabajos que comparen el efecto que tienen los distintos compuestos reguladores sobre el metabolismo y patrón de desarrollo observado (Biondi y Thorpe, 1982; von Arnold y Grönroos, 1986).

Debido a lo anterior, se planteó estudiar el efecto que tienen dos combinaciones de reguladores de crecimiento en la morfogénesis *in vitro* de *P. macrolepis*. Siendo *P. macrolepis* una conífera, se espera encontrar un patrón de organogénesis similar a lo que ha sido reportado para otras coníferas cultivadas *in vitro*. Además, se espera encontrar diferencias en la forma en las cuales se expresa la organogénesis directa, así como en los sitios del explante donde esta expresión se lleva a cabo, como resultado de los distintos tratamientos. Cabe señalar, que a causa de la baja respuesta morfogénica que presentan los embriones de *P. macrolepis*, éste dista de ser un modelo para el estudio de la morfogénesis *in vitro*; sin embargo, este tipo de estudio puede resultar útil para comprender mejor el impacto que tiene el tipo de regulador de crecimiento (citocinina)

sobre el explante durante el cultivo y sobre la formación de estructuras. Por este motivo y debido a que se desconoce cómo se presenta el proceso morfogénico en los cultivos *in vitro* de embriones maduros de *P. macrolepis*, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar la ontogenia de los brotes formados mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *P. macrolepis*, sometidos a dos tratamientos diferentes: ANA/BA y 2,4-D/K.

### Objetivos particulares

- a) Obtener la formación de brotes a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros, con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento: ANA/BA y 2,4-D/K.
- b) Estudiar y comparar la ontogenia de los brotes en cada una de las fases de desarrollo (inducción, proliferación, crecimiento de brotes), mediante la utilización de técnicas histológicas.
- c) Realizar estudios histoquímicos de los embriones para inferir acerca de los procesos fisiológicos que se presentan durante el desarrollo de brotes en los explantes.
- d) Inferir, con base en los análisis histológicos e histoquímicos, cómo influyen los reguladores de crecimiento en los procesos celulares que conllevan a una respuesta morfogénica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cultivo in vitro de P. macrolepis*

#### Pretratamiento de la semilla

Las semillas limpias se colocaron en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% (v/v) durante 60 minutos en agitación para su escarificación. Posteriormente, se desinfectaron en una solución fungicida (Benomyl 0.5 g/l) durante 24 horas. Al finalizar este tiempo, las semillas se agitaron, primero en una solución bactericida (cloranfenicol 20 mg/l) durante 45 minutos y luego en blanqueador doméstico al 15% (v/v) (6% de cloro activo) durante 60 minutos; después de lo cual se sumergieron en  $H_2O_2$  al 1% (v/v) por 48 horas en refrigeración. Las semillas que presentaron megagametofito se seleccionaron y se eliminó la testa en condiciones de asepsia. Los megagametofitos se sumergieron en cloro comercial al 15% (v/v) durante 60 segundos, para luego disectar el embrión, que antes de ser cultivados fueron lavados en la solución de cloranfenicol durante 30 segundos. Cabe señalar, que después de cada uno de los tratamientos de desinfección y escarificación, las semillas, megagametofitos o embriones se enjuagaron en agua destilada estéril.

#### Cultivo de embriones

A.- INDUCCIÓN. Se cultivaron de 10 a 12 embriones completos en cajas petri, sobre el medio Schenk y Hildebrandt (SH) (Anexo 1), solidificado con Phytigel® (6g/l), al cual se le adicionó ANA/BA o 2,4-D/K a las concentraciones respectivas de 0.53/13.32  $\mu$ M. El pH del medio fue estabilizado entre 5.7 y 5.8 antes de ser esterilizado. La incubación se realizó a 22°C, bajo luz blanca, fría, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad durante 30 días.

B.- FORMACIÓN DE BROTES Y ELONGACIÓN DE TALLO Y HOJAS. Posteriormente al tiempo de inducción, los explantes se subcultivaron sobre medio SH reducido al 50% sólo en sus componentes inorgánicos, con sacarosa al 0.3% y sin reguladores de crecimiento. También se le adicionó polivinilpirrolidona (250 mg/l) como agente antioxidante y un

agente antivitrificante (0.5 g/l). Los brotes formados se individualizaron una vez que alcanzaron una longitud de 7 a 10 mm. Los explantes y brotes disectados se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación citadas anteriormente y se subcultivaron quincenalmente.

#### Técnicas histológicas

Se basaron en las técnicas mencionadas por López-Curto *et al.* (1998).

A.- FIJACIÓN. Se colectaron de 4 a 6 explantes intactos y muestras a los 3, 6, 10, 12, 14, 16, 22, 30 de cultivo sobre medio SH con reguladores de crecimiento, y a los 45 y 90 días de cultivo sobre medio SH50% sin reguladores de crecimiento. Ésos se fijaron inmediatamente con FAA (Formol, ácido acético, alcohol 96% y agua destilada, 1: 0.5: 5: 3.5 ) durante un mínimo de 48 horas.

B.- DESHIDRATACIÓN. Los explantes fijados fueron enjuagados en agua corriente durante un mínimo de una hora y posteriormente se transfirieron de manera gradual en una serie de diluciones de alcohol etílico (al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%), realizándose los cambios cada hora.

C.- INCLUSIÓN. Se manejaron dos técnicas de inclusión: en Paraplast y en LR White (LRW). Para la técnica de inclusión en Paraplast, las muestras se sumergieron en xilol durante 10 minutos, y luego se transfirieron gradualmente a mezclas de xilol -Paraplast derretido en proporciones de 3:1, 1:1; y 1:3, durante una hora cada una. Posteriormente se colocaron en paraplast puro durante un mínimo de 24 horas a 56°C, para luego proceder a su inclusión.

Para la técnica de LRW , se colocaron las muestras durante 1 hora en mezclas de LRW-etanol al 100% en proporciones de 1:3, 1:1, 3:1. Posteriormente se colocaron en LRW al 100% durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se incluyeron en LRW puro, en cápsulas de gelatina y se polimerizaron en ausencia de oxígeno a 56°C (Ruzin, 1999).

**D.- MICROTOMÍA.** Se obtuvieron cortes seriados en Paraplast de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor mediante el uso de un microtomo de rotación; las muestras incluidas en LRW se cortaron a 1-3  $\mu\text{m}$  utilizando un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio. Para el análisis histoquímico, se realizaron cortes en fresco de 8  $\mu\text{m}$  de grosor, por medio de un microtomo de congelación.

**E.- TINCIÓN E HISTOQUÍMICA.** En los cortes de inclusión en Paraplast, se llevó a cabo la tinción doble de safranina-verde rápido, para contrastar el núcleo y figuras mitóticas, citoplasma y pared celular. Los cortes incluidos en LRW se tiñeron con azul de Toluidina.

Se realizaron diferentes tinciones para localizar e identificar los siguientes compuestos:

- 1) Polisacáridos insolubles y proteínas totales: a través de la técnica de tinción doble de Ácido Periódico-reactivo de Schiff (APS) y azul negro de naftol. Los polisacáridos tiñeron color fucsia, mientras que las proteínas tomaron una coloración azul;
- 2) Taninos condensados: se utilizó vainillina, una coloración roja confirmó una reacción positiva;
- 3) Almidón: se uso lugol; los gránulos tomaron una coloración azul-negra;
- 4) Lípidos: con rojo "O" de aceite o Azul Nilo. Con rojo "O" de aceite los lípidos se tiñeron de rojo; con Azul Nilo, grasas, aceites y ceras se tiñeron de rojo, mientras que ácidos grasos libres y fosfolípidos tiñeron de azul.

## RESULTADOS

### Observaciones

Para la descripción del proceso morfogénético de los cultivos *in vitro* e estudio, se tomó como punto inicial al embrión maduro al momento de ser cultivado, el cual se dividió en cuatro zonas: cotiledones, hipocotilo (que comprende el resto del embrión bajo los cotiledones exceptuando a la radícula), la radícula (que incluye meristemo radicular (MR), columela de la cofia y células de la cofia) y el meristemo apical del tallo. De estas zonas, se describieron los cambios observados en la protodermis, en el mesófilo de los cotiledones y córtex del hipocotilo, en el procambium, en ambos meristemas y en la cofia.

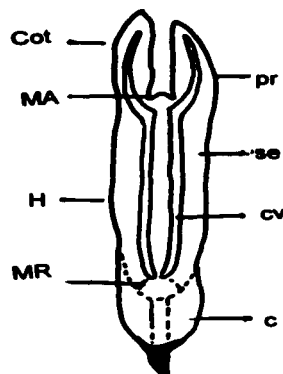


Fig. 4. Esquema de un embrión maduro. MA: meristemo apical del tallo; MR: meristemo radicular; H: hipocotilo; Cot: cotiledones; pr: protodermis; se: subepidermis; cv: cilindro vascular; c: cofia.

Se definió a las regiones con apariencia meristemática como aquellas donde se observaron células relativamente pequeñas, isodiamétricas, con núcleo prominente y céntrico y citoplasma denso, que formaban agrupaciones relativamente compactas, con pocos espacios intercelulares, que dieron positivo para proteínas al teñirse fuertemente con azul negro de naftol.

### Control

Los embriones intactos presentaron la morfología típica de un embrión de conífera: 6 a 7 cotiledones, en medio de ellos el meristemo apical del tallo, el hipocotilo y la radícula que comprende también al meristemo radicular y a la cofia. Tienen un color amarillo pálido y miden de 2 a 2.5 mm de longitud. El embrión durante esta etapa tiene la apariencia de un cono, cuya base corresponde a los cotiledones y el ápice a la cofia (Fig. 4).



La protodermis, tanto de los cotiledones como del eje hipocotilo-radícula (H-R), está formada por un solo estrato de células rectangulares (aplanadas longitudinalmente); sin espacios intercelulares visibles (Fig. 5-A). En general, las células de la superficie abaxial de los cotiledones son más aplanadas que las de la superficie adaxial, las cuales tiene una apariencia un poco más cúbica. El núcleo ocupa de un cuarto a un tercio del espacio intracelular y el interior de la célula se ve con poco o sin material granular que se tñe con safranina.

El tejido fundamental, tanto de los cotiledones como del hipocotilo, está formado por células parenquimáticas rectangulares-cúbicas, dispuestas ordenadamente a lo largo del eje, con pocos espacios entre ellas, con inclusiones de diversos tamaños muy abundante, principalmente lípidos, sobretodo en las capas más externas (Fig. 5-A y 5-B). Aunque se observó la presencia de gránulos de almidón en algunas regiones del hipocotilo, éste en general fue poco abundante. En los cotiledones el tejido fundamental está conformado por 3 a 5 estratos de células rodeando a los haces pro-vasculares, mientras que en el eje H-R se ve formado por 9 a 10 estratos celulares. Comúnmente en el estrato hipodérmico del hipocotilo se encontraron células alargadas, con citoplasma denso con un núcleo grande y alargado, que pudieran corresponder a los canales secretores descritos por Allen (1947b), en los cuales se observó una abundante acumulación de lípidos, probablemente ácidos grasos libres, según lo que mostró la tinción con Azul Nilo (Fig. 5-B).



Fig. 5. Cortes longitudinales del hipocotilo. (A) Note la acumulación de inclusiones celulares, teñidas con safranina-verde rápido; la flecha señala la protodermis; (B) Corte teñido con azul Nilo para evidenciar la presencia de lípidos; en este caso, la mayoría corresponden a ácidos grasos libres y fosfolípidos (C: canal secretor).

Por su parte, la región del tejido provascular del embrión está formada por células y núcleos alargados y angostos, los cuales se diferenciarán en los haces vasculares, así como por células más redondeadas que corresponden al parénquima asociado a los haces vasculares. En los cotiledones el tejido provascular está formado por 7 a 9 hileras de células hacia la región basal del mismo, que disminuyen a medida que se acerca al ápice, con material granular presente aunque poco abundante. En el hipocotilo, tiene de 7 a 16 hileras, siendo las dos o tres hileras centrales de una apariencia totalmente distinta a las circundantes ya que sus células son más grandes, cuadradas-rectangulares, con abundante material granular, especialmente en regiones próximas al meristemo apical.

El meristemo apical del tallo está constituido por células relativamente isodiamétricas, de núcleo prominente (ocupa la mayor parte del citoplasma), carentes de material granular, que forma una estructura de domo característica, de 4 a 5 hileras de células, cuya capa más externa tiene de 6 a 8 células (Fig. 6).

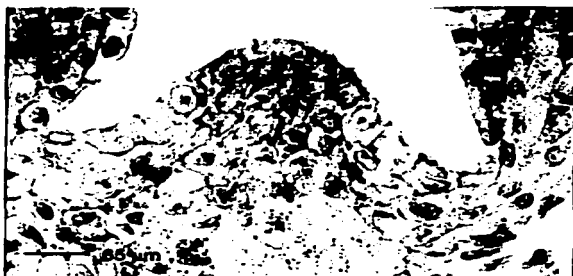


Fig.6. Meristemo apical del tallo.

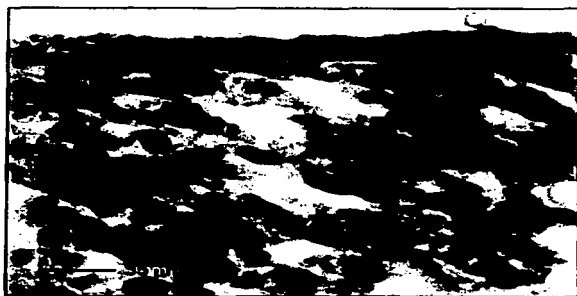


Fig. 7. Corte longitudinal de la cofia del embrión teñida con lugol; la mayor acumulación de almidón (inclusiones negras) se observa en el estrato celular superficial de la cofia .

La radícula incluye a la zona del meristemo radicular y la cofia. La zona del meristemo radicular está formada por células redondeadas, de núcleo grande, con poco o nulo material granular, a partir de los cuales se extienden en dirección al meristemo apical, el cilindro central y hacia la cofia la columela, la cual tiene de 3 a 5 células de espesor y es

rica en inclusiones sobre todo en las regiones más próximas al meristemo. Las células laterales de la cofia son alargadas e inclinadas, convergen hacia la columela del embrión. Se observan pocos espacios intercelulares, excepto en la parte más distal de la cofia, así como poco material granular. Cabe señalar que en el estrato externo de células de la cofia se notó una considerable acumulación de almidones, los cuales no fueron tan evidentes en el resto del embrión (Fig. 7).

En ninguna de las regiones descritas se observaron figuras mitóticas.

#### Tres días de cultivo

A los tres días de cultivo *in vitro*, se observaron cambios morfogenéticos en los embriones de ambos tratamientos, iniciando con un ligero crecimiento por el aumento en su longitud total y en el grosor, especialmente de la región correspondiente a la radícula-cofia. Asimismo, se observó el curvamiento de los embriones, quedando cóncavos con respecto al medio de cultivo y un cambio de coloración de amarillo pálido a amarillo brillante y en algunos casos, a rosado a lo largo del eje H-R.

A nivel estructural, en ambos tratamientos, se observó que la protodermis tanto de los cotiledones como del hipocotilo, mantuvieron el citoplasma denso y sin inclusiones. Por su parte, las células del tejido fundamental presentaron una forma rectangular y un incremento en el tamaño de las vacuolas, y en general muy pocas divisiones en esta etapa. En ANA/BA el curvamiento del embrión pareció relacionarse al incremento en el volumen de las células, a diferencia de las células del córtex del hipocotilo de la superficie alejada del medio (SAM), las cuales presentaron vacuolas más grandes y por tanto un citoplasma reducido en comparación a las de la superficie en contacto con el medio (SCM); en general este fenómeno no fue tan evidente en 2,4-D/K.

Por otra parte, se notó una disminución considerable de las inclusiones en el tejido fundamental (Fig. 8-A y 8-B), particularmente de los gránulos más pequeños,

observándose la presencia de gránulos más grandes que se concentraron sobretudo en las regiones más próximas a los haces provasculares y en las regiones adyacentes por abajo del meristemo apical del tallo; lo cual sería quizás un indicador del incremento en la actividad metabólica de los tejidos.

En el tratamiento de ANA/BA, se observó a su vez, un posible -y ligero- aumento del grosor de esta región, lo cual indicaría que se presentaron divisiones periclinales en la zona, aunque no se registraron mitosis en el meristemo radicular ni en el córtex circundante. A diferencia de lo anterior, en los explantes tratados con 2,4-D/K, se observó que las células de la zona del córtex próxima al meristemo radicular presentaron una actividad mitótica considerable, al parecer de distribución azarosa, observándose divisiones tanto anticlinales como periclinales, sobretudo en los estratos superficiales (Fig. 8-A).

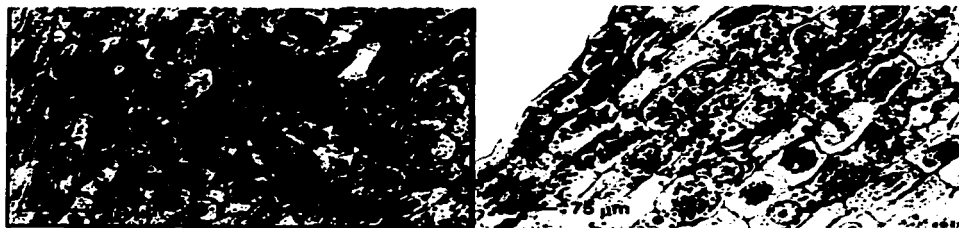


Fig. 8. Corte longitudinal del eje H-R a los 3 días de cultivo. (A) Se pueden observar varias divisiones, en su mayoría anticlinales en un embrión tratado con 2,4-D/K (flechas) ; (B) Note la disminución en la cantidad de inclusiones celulares con respecto al control.

En la región de la radícula se observó el crecimiento de la región de la radícula-cofia que se debió probablemente a un incremento en el volumen de las células, así como a un incremento en los espacios intercelulares, que le da una apariencia laxa y ligeramente desarrayada a la cofia, especialmente en las porciones más distales.

Para ambos tratamientos el meristemo apical del tallo presentó poca actividad, aunque en 2,4-D/K se llegaron a observar algunas células en mitosis.

#### Seis días de cultivo

A los 6 días de cultivo los embriones de ambos tratamientos midieron entre 3 y 5 mm de longitud y presentaron aumento de volumen de la región final de la radícula, en particular de la cofia, la cual tomó una apariencia hidratada y brillante, hialina-blanquecina. Se observó también el engrosamiento y alargamiento de los cotiledones, aunque mantuvieron una apariencia lisa y compacta y un cambio de coloración a un amarillo más intenso o verde.

Histológicamente, uno de los aspectos más notorios, en ambos tratamientos, fue la presencia de taninos condensados en las células de la protodermis, tanto de los cotiledones como del hipocotilo (Fig. 9), con una acumulación ligeramente mayor en las células de la superficie que estuvo en contacto con el medio.

Si bien este fenómeno se observó por primera ocasión a los seis días de cultivo, se mantuvo hasta los 90 días. Por otra parte, se obtuvo una disminución notoria de las inclusiones en las células del córtex, mesófilo y haces provasculares. Hubo un incremento en la cantidad de mitosis, especialmente en la protodermis y en los primeros estratos hipodérmicos, mientras que en las células donde no se observó este tipo de respuesta, se incrementaron ligeramente las vacuolas, aunque siguieron presentando citoplasma denso.

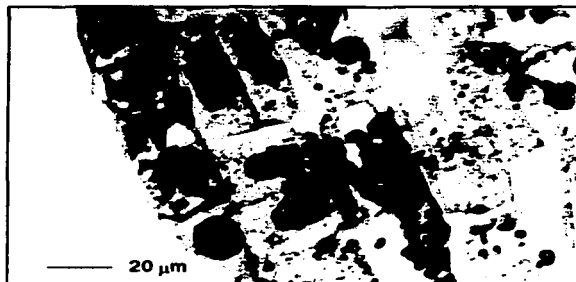


Fig. 9. Corte longitudinal del hipocotilo a los 6 días de cultivo, donde se observan divisiones periclinales y anticlinales en la sub epidermis, así como la acumulación de taninos en la protodermis (flecha).

Así mismo, se observó un aumento en el volumen de las células pertenecientes a la región del meristemo radicular así como divisiones en el córtex circundante; hacia el ápice del meristemo radical se formó un cinturón de células, de forma irregular que presentaron la acumulación de taninos condensados. Las células laterales y centrales de la cofia se alargaron y formaron grandes espacios intercelulares, lo cual le dio una apariencia y consistencia muy laxa al tejido y se evidenció el inicio de la degeneración de esta zona.

#### ANA/BA

En general, en los cotiledones se presentó una actividad mitótica considerable. En la protodermis se detectaron algunas divisiones anticlinales, mientras que en el mesófilo se observaron divisiones tanto anticlinales como periclinales, particularmente en las capas más superficiales. En las células provasculares, se registraron también divisiones mitóticas, así como la diferenciación de algunas de estas células en traqueidas.

En el hipocotilo se notó una tendencia hacia la localización de las divisiones celulares en la protodermis y el primer y segundo estrato subepidérmico, las cuales fueron tanto anticlinales como periclinales y oblicuas (Fig. 10-A, 10-B y 10- C). Las células protodérmicas del hipocotilo presentaron principalmente divisiones anticlinales, aunque en algunas regiones se observaron dos estratos de células, lo cual indica que se presentaron divisiones periclinales en esta capa celular; cabe señalar que éstas células protodérmicas presentaron usualmente una menor tinción con safranina que el resto (Fig. 10-A y C).

Generalmente el córtex asociado a regiones de protodermis biestratificada presentó también divisiones celulares. Las divisiones fueron más abundantes en la superficie en contacto con el medio (SCM) y se observaron con frecuencia agrupaciones de tres y cuatro células (clusters), originados primero por una división periclinal seguida por una anticlinal de una célula (Fig. 10-B) y ocasionalmente la formación de promeristemoides (Fig. 10-D), así como el principio de la formación de zonas meristemáticas (Fig. 10-C) La actividad mitótica se registró también en el eje provascular y en células circundantes,

donde se presentaron divisiones anticlinales, relacionadas probablemente al crecimiento general del explante.

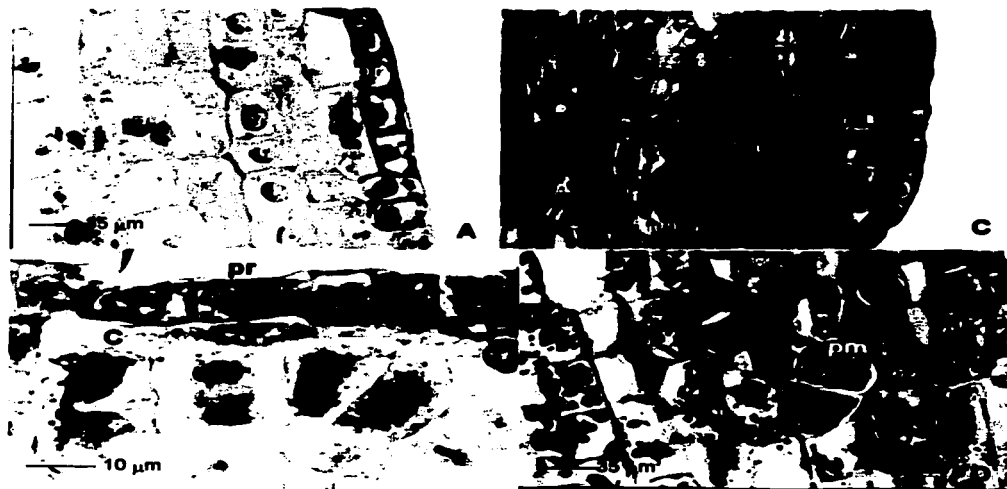


Fig. 10. Cortes longitudinales a los 6 días de cultivo en ANA/BA. (A) Divisiones periclinales en la protodermis (pr) y anticlinales en la subepidermis del hipocotilo, SCM ; (B) Aparición de inclusiones en la protodermis, así como divisiones periclinales y oblicuas en la subepidermis, bajo un canal (c) SCM; (C) Formación de una zona meristemática, SCM, así como divisiones periclinales en la protodermis; (D) Promeristemoide (pm) en el córtex asociado a los haces vasculares.

En el meristemo apical del tallo se detectaron divisiones celulares anticlinales en la capa más externa, así como algunas divisiones periclinales y anticlinales en el interior. Sin embargo, la actividad en esta región siguió siendo baja.

Por medio de las tinciones con APS-azul negro de naftol se observó que los gránulos presentes en las capas epidérmicas que se tiñen intensamente con safranina, no son polisacáridos insolubles ni proteínas; por otro lado, se encontró que la región de la cofia es rica en polisacáridos insolubles que se presentan formando pequeños gránulos o un contenido difuso en los espacios intercelulares.

## **2,4-D/K**

En los cotiledones, las células del mesófilo, se observaron agrandadas, ligeramente desordenadas, con espacios intercelulares, lo cual dio indicios acerca de una desorganización en este tejido. Cabe mencionar que muchas de estas células presentaron vacuolas muy grandes, poco citoplasma y el núcleo aplanado. El tejido provascular presentó la diferenciación de algunas traqueidas, así como unas pocas divisiones celulares.

En el hipocotilo, se registraron para la protodermis divisiones anticlinales. En la región subepidérmica se evidenciaron divisiones celulares anticlinales, periclinales y oblicuas, así como la formación de cúmulos de 4 a 6 células arregladas en hileras de dos. En células próximas al eje vascular se observaron algunas divisiones periclinales, aunque menos abundantes que en el tratamiento con ANA/BA.

Se observó un ligero crecimiento del meristemo apical del tallo, debido a divisiones en el interior del mismo.

### **Diez días de cultivo**

A los 10 días de cultivo, los embriones que respondieron a los tratamientos midieron entre 4 a 5 mm de longitud y presentaron un incremento notorio en el grosor, particularmente de los cotiledones. Los cotiledones, aunque engrosados, presentaron aún una apariencia lisa y compacta, así como un cambio de coloración a verde brillante que abarcaba hasta  $\frac{3}{4}$  partes del hipocotilo (sin incluir la radícula-cofia); superficialmente no se observaron diferencias entre ellos según su posición con respecto al medio. La radícula-cofia tomó una apariencia aún más hidratada, hialina-blanquecina, con una tendencia a volverse granulosa y en algunos casos comenzó a tomar una coloración café. Entre la porción verde brillante del hipocotilo y la cofia hialina, se observó la formación de una interfase blanquecina. En esta fecha no se observó la presencia de protuberancias o estructuras.



## ANA/BA

Se registraron divisiones anticlinales en las células de la protodermis de los cotiledones las cuales presentaron un núcleo prominente. En general, las células del mesófilo se presentaron agrandadas, desarregladas con espacios intercelulares abundantes, con vacuolas grandes, aunque también se presentaron células pequeñas con núcleos prominentes en varias capas cercanas a la protodermis, sobretodo en la parte del cotiledón en la SAM. En el tejido pro-vascular se distinguieron algunas divisiones anticlinales así como la diferenciación de traqueidas.

En el hipocotilo, la epidermis presentó características similares a las del cotiledón, si bien las células tendieron a presentar una forma más cúbica. Por su parte, en las regiones del córtex, particularmente en las capas más próximas a la protodermis, se observaron divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas, así como agrupamientos de 4 y 8 células con núcleo prominente que formaron

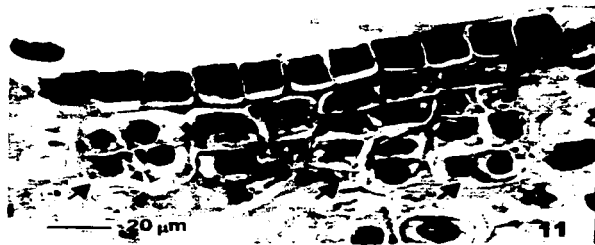


Fig. 11. Corte longitudinal de hipocotilo a los 10 días de cultivo, en ANA/BA mostrando la formación de agrupamientos celulares en la SCM.

pilas, más abundantes en la SCM (Fig. 11). En la superficie contraria, las células de esta región fueron más grandes y desordenadas. En la porción central del eje vascular se observaron células muy grandes, muy engrosadas en comparación al resto, así como algunas divisiones; también se apreció la diferenciación de algunas traqueidas.

En la parte del embrión correspondiente a la radícula, en ambos tratamientos, se observó mitosis en células redondeadas de la zona meristemática, así como en la región pro-vascular más cercana. Las capas superficiales del córtex, a la altura del meristemo radicular, presentaron una acumulación considerable de taninos condensados (12-A), así

como un desarreglo generalizado en las regiones más distales de la cofia que tendió a desgarrarse al realizarse los cortes debido a su laxitud. La prueba histoquímica de PAS mostró también una fuerte acumulación de algún polisacárido, formando una matriz alrededor de las células de la cofia (12-B).

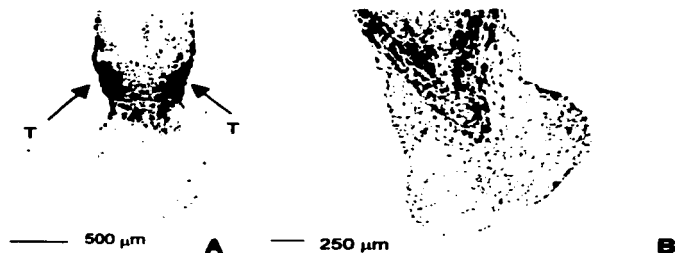


Fig. 12. Meristemo radicular y cofia a los 10 días de cultivo. Enambos tratamientos. (A) cofia desorganizada con la acumulación de taninos (T) en el córtex que rodea al meristemo radicular;(B) presencia de una matriz extracelular de polisacáridos en la cofia .

En la parte del embrión correspondiente a la radícula, en ambos tratamientos, se observó mitosis en células redondeadas de la zona meristemática, así como en la región pro-vascular más cercana. Las capas superficiales del córtex, a la altura del meristemo radicular, presentaron una acumulación considerable de taninos condensados (12-A), así como un desarreglo generalizado en las regiones más distales de la cofia que tendió a desgarrarse al realizarse los cortes debido a su laxitud. La prueba histoquímica de PAS mostró también una fuerte acumulación de algún polisacárido, formando una matriz alrededor de las células de la cofia (12-B).

En el meristemo apical del tallo se observaron algunas divisiones celulares, anticlinales en la capa exterior, anticlinales y periclinales en el resto, que produjo un ligero incremento en el número de células, que se volvieron mas pequeñas, aunque no aumentó notoriamente el tamaño de la estructura en general. Por debajo de la región meristemática, donde confluye con los haces pro-vasculares, se observó la acumulación de células con taninos.

## **2,4-D/K**

En los cotiledones, se apreció, sobretodo en las primeras capas, que las células del mesófilo se encontraban muy agrandadas, desordenadas y con abundantes espacios intercelulares, es decir, se observó el inicio de una desorganización en este tejido. En la región vascular continuó la diferenciación de traqueidas.

En el hipocotilo, se obtuvo la formación de algunas protuberancias; las células protodérmicas tomaron una forma cúbica. El córtex presentó células agrandadas, algo irregulares y desarregladas, aunque en ciertas partes la primera capa de células bajo la epidermis presentó una disposición muy ordenada, de células de igual tamaño, que contrastó con las circundantes. Continuó la acumulación de material granular en las células debajo del meristemo apical, las cuales tuvieron un mayor tamaño en comparación a las células del meristemo y una forma irregular.

El número de células que conforman el estrato externo del meristemo apical del tallo se incrementó notoriamente, debido a divisiones anticlinales en esta región, aunque no se registraron mitosis para las células interiores del mismo, que en realidad tuvieron una apariencia un poco aplanada. En algunas células de la capa externa del MA, se apreció la acumulación de taninos, así como en la parte del mismo que se conecta con los haces vasculares.

### **Doce días de cultivo**

Los embriones a esta fecha aumentaron su longitud de 5 a 6 mm. Presentaron los cotiledones engrosados de color verde brillante al igual que los dos tercios superiores del hipocotilo, y mantuvieron una apariencia lisa y compacta. La radícula y la cofia se vieron hidratadas y se inició la oxidación del extremo más distal, el cual presentó una textura pegajosa y friable que tendía a desprenderse con facilidad del resto del explante al ser manipulado. En embriones expuestos al 2,4-D/K, se observó la formación de pequeñas

protuberancias en las superficies laterales del embrión, sobre la porción superior del hipocotilo y en la superficie externa de los cotiledones.

#### ANA/BA

En general se detectó poca actividad meristemática en los cotiledones; la mayoría de las células del mesófilo se encontraron agrandadas por la presencia de vacuolas prominentes, aunque mantuvieron un arreglo y una orientación ordenada en el tejido.

En el hipocotilo se hicieron evidentes algunas ondulaciones de la superficie, particularmente hacia la mitad más cercana al meristemo radical. Estas ondulaciones se encontraron tanto en la SCM como en la SAM y fueron producto de la actividad de células protodérmicas y del córtex, ya que se registraron divisiones tanto anticlinales como periclinales en estos estratos. En la SAM se formaron las primeras protuberancias producto de divisiones de la protodermis y de células subepidérmicas, así como estructuras cuya apariencia semejó a los meristemoides (Fig. 13-A). Al parecer estas estructuras también tuvieron un origen doble (a partir de divisiones en ambos estratos) ya que se encontraron evidencias de que la protodermis no solo forma un estrato de células superficiales sino que participa en agregar células al cuerpo de la estructura mediante divisiones periclinales. Este comportamiento podría no ser tan inusual si se toma en consideración que en los meristemas apicales de las gimnospermas la capa externa frecuentemente presenta tanto divisiones anticlinales como periclinales. Cabe señalar que las células protodérmicas que formaron parte de estructuras presentaron por lo regular una menor acumulación de taninos en comparación con las células protodérmicas circundantes.

En la SCM del explante, las células meristemáticas se arreglaron formando regiones más amplias que comprendían de dos a tres estratos y más de 15 células, también de origen doble (zonas meristemáticas) (Fig. 13-B). En general se observó la acumulación de células llenas de material (taninos condensados) en el córtex bajo las zonas meristemáticas.

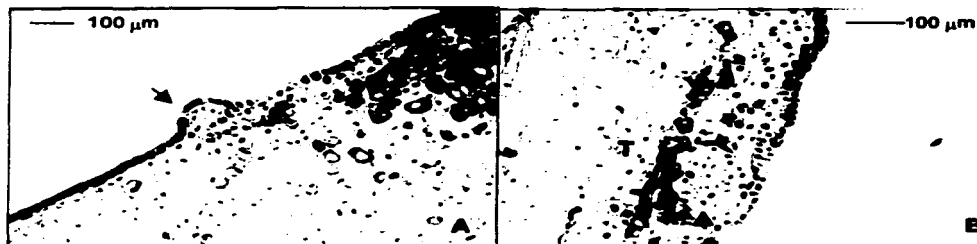


Fig. 13. Corte longitudinal de hipocotilo a los 12 días de cultivo en ANA/BA. (A) Meristemoide en la SAM (flecha) (B) Zona meristemática en la SCM, formada por divisiones de la protodermis y subepidermis con posible formación de un meristemoide (flecha); acumulación de taninos (T) en las células interiores.

El tejido fundamental del hipocotilo y del cotiledón, exceptuando a las células con apariencia meristemática, se conformó por células grandes, relativamente cuadradas, con vacuola prominente y espacios intercelulares grandes. En general no se registraron mitosis.

En cuanto al procambium del embrión, se observó el engrosamiento de las células así como el desarrollo de algunas traqueidas. El parénquima asociado al procambium, por su parte, tomó una apariencia muy distinta al resto de los tejidos que lo rodean. Aparentemente está formado por células con vacuolas muy grandes y con paredes muy delgadas, relativamente rico en la acumulación de material granular, que se vió fuertemente afectado por el procesamiento al que fue sometido el embrión durante su preparación para el corte, ya que tendió a separarse del resto de los tejidos y romperse durante (o quizás antes) la inclusión. Cabe señalar que este tipo de tejido se encontró a partir de los 12 días de cultivo en todos los explantes independientemente del regulador de crecimiento al que fuera sometido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La cófia se encontró disgregada sobretodo en las partes externas debido a la presencia de espacios intercelulares grandes que promovieron la separación de las células durante la inclusión. Se observó la acumulación de una gran cantidad de material (taninos

condensados) que separaba la cofia en desintegración del resto de los tejidos del embrión, aunque este resultó un fenómeno común en ambos tratamientos (Fig. 14-B).

#### 2,4-D/K

En estos embriones, la actividad meristemática de los cotiledones se vio restringida a los ápices de los mismos, aunque a este tiempo no fue posible distinguir si se debió a la formación de un meristemoide o si eran el reflejo del alargamiento de estos órganos. Bajo estas regiones se localizaron células grandes que acumularon una gran cantidad de taninos condensados. El resto de las células del mesófilo presentaron vacuolas grandes y un arreglo muy laxo por los grandes espacios intercelulares.

El hipocotilo presentó un córtex de apariencia muy similar al de los cotiledones, aunque se notó un mayor desarreglo en las células de la SAM. Las regiones meristemáticas se observaron también con ondulaciones en la superficie, sobretudo en la SCM. Aquí nuevamente se observó el desarrollo de zonas meristemáticas, formadas por dos a tres estratos de células, donde parte del estrato subepidérmico más externo pareció haberse originado a partir de divisiones periclinales de la protodermis. También se observó la aparición de pequeñas agrupaciones de células meristemáticas en las regiones intercotiledonarias (Fig. 14-A).

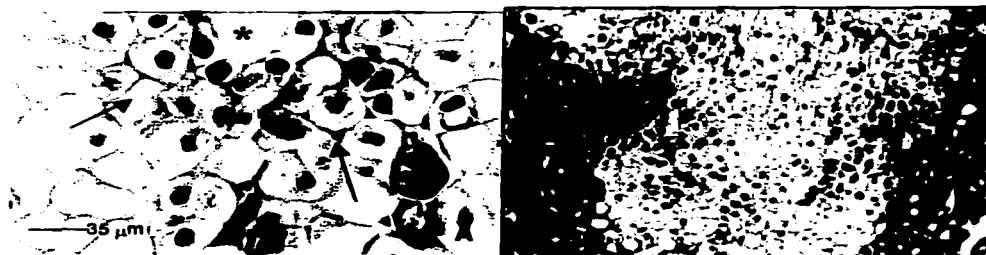


Fig. 14. Cortes longitudinales a los 12 días de cultivo en 2,4-D/K. (A) Formación de un meristemoide (flechas) en la región intercotiledonaria (\* señala espacio intercotiledonario); (B) Región del meristemo radicular: células cuyo citoplasma y núcleo se tiñen fuertemente en el córtex y abundante acumulación de taninos en las células superficiales.

La zona del meristemo radicular y su parénquima circundante presentó una gran actividad mitótica así como la formación de agrupaciones de 2, 3 y 4 células; esta actividad fue más notoria en lo que correspondería a las superficies laterales del embrión con respecto a su posición sobre el medio durante el cultivo, en los tejidos que no se encuentran en contacto directo con el medio.

#### Catorce días de cultivo

A los 14 días de cultivo y a partir de entonces, en ambos tratamientos se observó un crecimiento notorio del embrión, pero particularmente un engrosamiento de los cotiledones; éstos tomaron una coloración verde brillante. Por otra parte, la radícula continuó con su proceso de degeneración. En general presentaron pocas diferencias con respecto a los 12 días de cultivo, aunque en algunos explantes, la superficie en contacto con el medio empezó a tomar una coloración ligeramente parda.

Histológicamente, se observó que las células del córtex embrionario tenían un arreglo laxo por la presencia de abundantes espacios intercelulares; por lo regular presentaron una vacuola grande, núcleo pequeño y poco citoplasma. Cerca de las regiones meristemáticas y alrededor de los haces vasculares, las células acumularon una gran cantidad de material, probablemente taninos condensados. Por su parte, las regiones meristemáticas son las únicas que mantuvieron una apariencia de tejido compacto.

#### ANA/BA

En este tratamiento se observó una considerable actividad mitótica en los cotiledones en comparación con fechas anteriores. Las zonas meristemáticas se organizaron formando una capa de 2 a 4 células de grosor en la hipodermis. En cortes externos de



Fig. 15. Corte longitudinal de hipocotilo a los 14 días de cultivo en ANA/BA. Zona meristemática subepidérmica, que pudiera estar organizándose para formar meristemoides (2). El resto de las células de córtex tienen vacuolas grandes.

estas regiones, la tinción con APS demostró la presencia de abundantes gránulos de polisacáridos insolubles, probablemente almidones.

Por su parte, en el hipocotilo se observó la formación de ondulaciones en la SAM durante el cultivo, aunque las zonas mersistemáticas (Fig. 15) se encontraron sobretodo en la porción del hipocotilo más cercana a los cotiledones, así como en regiones intercotiledonarias. En la SCM se observó el agrupamiento de estas células en el parénquima asociado al haz vascular cerca de la región del meristemo radicular.

#### 2,4-D/K

En general, la actividad meristemática de los cotiledones fue muy baja. Éstos tomaron una apariencia engrosada, donde el cotiledón en contacto con el medio fue, de manera regular, más corto que el resto de los cotiledones.

Por otro lado, en las superficies laterales del embrión o en aquellas más alejadas al medio durante el cultivo del hipocotilo, se observó la formación de los primeros nódulos, con la forma de un domo. La protodermis del embrión constituyó parte de la estructura, mientras que en el cuerpo se observaron divisiones periclinales, anticlinales y oblicuas. En general hubo una reducida actividad mitótica y meristemática en el resto del embrión. Cabe señalar que no se identificaron estructuras intermedias entre las agrupaciones de 3 a 4 células observadas en las etapas anteriores y estas agrupaciones mucho más amplias. En el análisis histoquímico se evidenció nuevamente la acumulación de gránulos de polisacáridos en los tejidos más externos del embrión.

#### Dieciseis días de cultivo

Los embriones presentaron algunas diferencias en talla y apariencia general en relación con aquellos descritos en la fecha anterior. Sin embargo, cabe señalar que para los 16 días se observó de manera generalizada la aparición de pequeñas protuberancias en la superficie del embrión. En ANA/BA se formaron pocas protuberancias y parecieron



limitadas a la superficie más alejada del medio; mientras que en 2,4-D/K éstas se observaron en la parte baja del hipocotilo, cerca de la zona de transición entre las porciones compactas y el tejido en degeneración de la radícula-cofia, así como en la base de los cotiledones en la superficie en contacto con el medio. La superficie de los cotiledones y del hipocotilo en contacto con el medio tomó una apariencia irregular. Se inició un desarrollo diferencial de los cotiledones en 2,4-D/K ya que aquellos más alejados al medio se encontraron ligeramente más alargados que el resto.

#### ANA/BA

Se observó que las células epidérmicas de la superficie adaxial del cotiledón presentaron una apariencia más aplanada y acumularon menos taninos que aquellas de la abaxial, las cuales se observaron más agrandadas, con la acumulación de mucho material y con tendencia a desorganizarse, especialmente en los cotiledones en contacto



Fig. 16. Corte longitudinal de un cotiledón a los 16 días de cultivo en ANA/BA. Yemas apicales en la superficie abaxial.

16

directo con el medio. En la región apical y lateral de los cotiledones se observó además la presencia de protuberancias nodulares y yemas apicales (Fig. 16), donde se evidenciaron divisiones anticlinales en la capa más externa y divisiones periclinales, anticlinales y oblicuas en las más internas. Por su parte, en el haz provascular se encontró una gran acumulación de material granular, tanto en el parénquima circundante como en las células alargadas que lo conforman.

En los tejidos del hipocotilo en contacto con el medio, se observó una considerable actividad mitótica que tendió a la formación de zonas meristemáticas continuas de 6 a 10 células de grosor, que dio origen a abultamientos. Hacia el interior del córtex se observó la

formación de agrupaciones de 3 a 4 células, que dieron la impresión de un desarrollo tardío o secundario de posibles estructuras organizadas (meristemoides). Así mismo, se observó el desarrollo de meristemoides formando un anillo en el sitio de transición entre el hipocotilo y la radícula; éstos resultaron probablemente de las divisiones observadas en etapas anteriores en la región del córtex. Se encontró además la presencia de células de tipo meristemático en las regiones intercotiledonarias, formando ya meristemoides y con traqueidas diferenciadas asociadas. En la superficie más alejada del medio la actividad mitótica pareció reducida y sólo se formaron pequeñas agrupaciones de células en la hipodermis.

Se observó el desarrollo del meristemo apical del tallo con la diferenciación de primordios foliares, así como la acumulación de una gran cantidad de taninos en las células del parénquima bajo esta estructura.

## 2, 4-D/K

La actividad mitótica de los cotiledones se centró principalmente en las superficies en contacto con el medio, donde se formaron zonas meristemáticas rodeadas por células con una gran cantidad de material granular, inclusive en la protodermis del mismo. Aunque en general, los cotiledones presentaron poca respuesta morfogénica.

En el hipocotilo se observó la formación de meristemoides, tanto en la superficie en contacto con el medio como en las superficies alejadas y laterales (Fig. 17-A y B); aunque cabe señalar que fueron poco abundantes. En cortes longitudinales estos meristemoides tuvieron alrededor de 3 a 5 células de grosor, donde se observó su asociación con traqueidas diferenciadas que no se relacionaron con el cilindro vascular del eje embrionario. Los meristemoides se encontraron sobretodo en las regiones subepidérmicas, aunque también se observaron algunos arreglos celulares concéntricos en el parénquima del córtex del embrión. Se observaron también zonas meristemáticas en la superficie en contacto con el medio (Fig. 17-C).

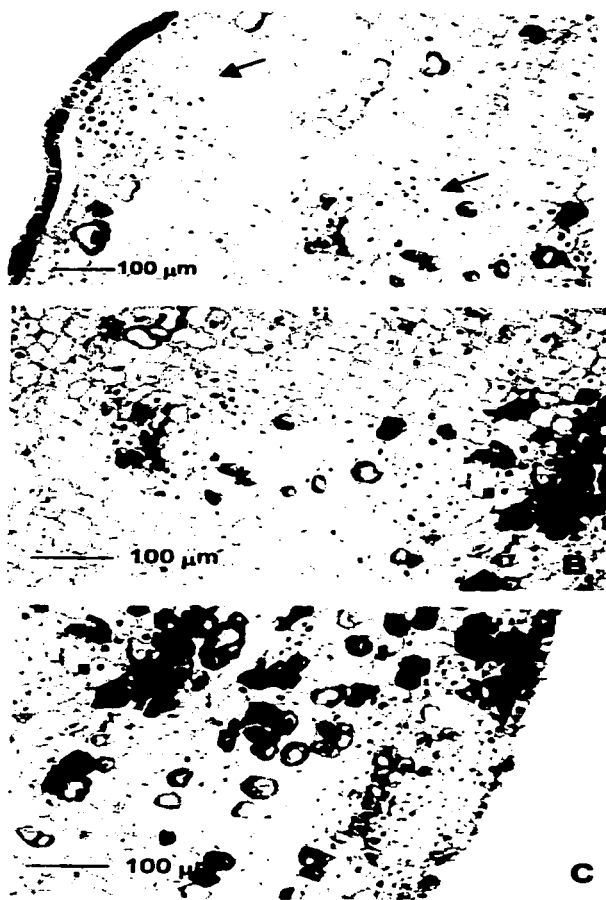


Fig. 17. Cortes longitudinales de hipocotilo a los 16 días de cultivo, 2,4-D/K.

- (A) Meristemoides en la SAM (flechas).  
 Note las divisiones periclinales en la protodermis, así como el canal en la subepidermis;  
 (B) Meristemoides en la superficie lateral;  
 (C) Zona meristemática en la SCM; note la acumulación de taninos.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### Veintidós días de cultivo

En esta fecha los embriones midieron entre 7 y 8 mm de longitud y presentaron una coloración verde brillante en los cotiledones y la parte superior del hipocotilo, mientras que la radícula inició su oxidación. En ANA/BA se observaron pocas protuberancias y en general éstas se presentaron en la base de los cotiledones, en las zonas intercotiledonarias y en la superficie abaxial de los mismos. En 2,4-D/K el desarrollo diferencial de los cotiledones fue mas notorio que en fechas anteriores, aquellos en contacto con el medio durante el cultivo se encontraron engrosados y más cortos que aquellos más alejados del medio. En estos embriones se formaron protuberancias y algunas hojas dispersas en el hipocotilo, en las superficies laterales así como en aquella más alejada al medio.

#### ANA/BA

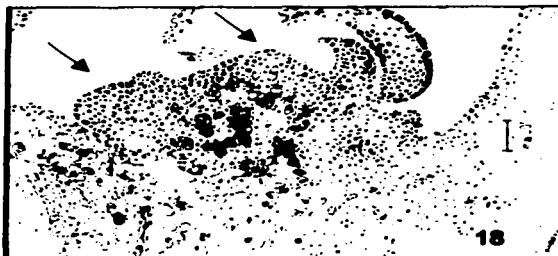
Los cotiledones tuvieron una apariencia similar a lo descrito para los 16 días de cultivo. Sin embargo, cabe señalar que se encontraron amplias zonas meristemáticas en la superficie de los cotiledones, que le dieron una apariencia ondulada a estos órganos. Estas regiones usualmente abarcaron toda la superficie externa y el ápice de los cotiledones y tuvo un grosor de 4 a 5 células, en la base de los cuales usualmente se encontró la asociación con traqueidas. Se registró también la formación de brotes en la superficie interna de los cotiledones.

En general la mayoría de las células del hipocotilo presentaron grandes vacuolas, el núcleo y el citoplasma aplanado contra las paredes de las células y carencia de material granular; asimismo tuvieron un arreglo muy laxo y parcialmente desorganizado. En células parenquimáticas del córtex asociado a los haces vasculares se encontraron arreglos concéntricos de células con núcleo y citoplasma prominente, posiblemente meristemoides, mientras que en las superficies laterales del embrión, con respecto a su posición sobre el medio durante el cultivo, se formaron ondulaciones por el desarrollo de zonas meristemáticas de origen epidérmico y subepidérmico, donde se visualizaron algunas yemas apicales. Bajo este tejido se encontraron células con una disposición muy laxa,

algunas de las cuales acumularon material amorfo de manera considerable, en algunos casos taninos condensados. Una importante actividad mitótica se observó también en el parénquima que rodea al meristemo radicular. Por otro lado, en la zona correspondiente al tejido provascular se encontraron traqueidas bien diferenciadas.

Cabe señalar que fue frecuente encontrar la formación de brotes (uno o más) a partir del meristemo apical del embrión.

Fig. 18. Meristemo apical del tallo a los 22 días de cultivo en ANA/BA. Dos brotes formados a partir del meristemo apical del tallo del embrión.



#### 2,4-D/K

Las células del mesófilo de los cotiledones más alejados del medio durante el cultivo, presentaron un mayor desarreglo que aquellos más cercanos a él, mientras que las células de la protodermis disminuyeron su tamaño, excepto en las superficies en contacto con el medio donde se llenaron de taninos condensados. Por lo regular las únicas regiones compactas correspondieron a las agrupaciones de células con apariencia meristemática (meristemoides), usualmente hacia el ápice de los cotiledones y en el tejido intercotiledonario.

Las mayoría de las células del córtex del hipocotilo fueron similares a lo anteriormente descrito. Se observó una actividad meristemática considerable en el hipocotilo donde se formaron regiones similares a las descritas para ANA/BA y se obtuvo la diferenciación de brotes con un par o dos de primordios foliares. También se obtuvo la respuesta de células del córtex, alejado de la superficie, en algunos de los embriones seccionados. Todas estas estructuras presentaron traqueidas diferenciadas asociadas, las cuales no parecieron tener relación con el cilindro vascular del embrión.

### Treinta días de cultivo

En los embriones sometidos al tratamiento con ANA/BA se observó un incremento notorio en el grosor de todos los cotiledones, independientemente de su posición con respecto al medio. Se obtuvo una mayor formación de brotes en los ápices de los cotiledones, así como en las superficies laterales del eje embrionario y en aquella más alejada del medio; mientras que las SCM se formó una menor cantidad de brotes que a su vez tendieron a desarrollarse con mayor lentitud. Por su parte en los embriones tratados con 2,4-D/K se observó una clara diferencia entre los cotiledones. Aquellos más distantes al medio se alargaron considerablemente y tomaron la apariencia que adquiere cualquier embrión germinado. En general estos cotiledones no formaron brotes. Los brotes se originaron solo a partir de los cotiledones de las superficies laterales o en contacto con el medio. En el hipocotilo se obtuvo la formación de brotes con hojas largas en la superficie alejada del medio, mientras que en la superficie contraria se obtuvo la formación de nódulos grandes e irregulares.

#### ANA/BA

Las células de la protodermis de los cotiledones se observaron muy delgadas a comparación de las células que conformaron el mesófilo, exceptuando aquellas que se encontraron en contacto directo con el medio durante el cultivo, las cuales se presentaron llenas de taninos condensados. Por su parte, el mesófilo se conformó por células muy grandes y de disposición irregular debido a los grandes espacios intercelulares. En general la actividad mitótica se limitó a las zonas meristemáticas (formada por estratos de 5 a 6 células de grosor) y a las yemas formados en los ápices de los cotiledones.

Por su parte, las superficies laterales del hipocotilo presentaron una gran actividad mitótica y meristemática que en la SCM dio origen a grandes nódulos. Estos nódulos estuvieron conformados por células de apariencia típicamente meristemática y hacia el centro presentaron células que acumularon material granular, a la vez que una disposición más laxa. Hacia el interior del córtex también se observó la presencia de agrupaciones de células con núcleo prominente, probablemente meristemoides, las cuales en ocasiones se

asociaron a traqueidas diferenciadas, aunque no parecieron tener relación directa con el cilindro vascular del eje embrionario. En SAM se obtuvo la formación de yemas apicales. El resto de las células del córtex se mantuvieron con las características descritas para fechas previas.

Fue común encontrar la formación de un brote a partir del meristemo apical del tallo del embrión o la formación de más de un brote a partir de este tejido. Por su parte, el parénquima alrededor del meristemo radicular también mantuvo una considerable actividad, aunque no para el desarrollo de la radícula sino para la formación de meristemoides. Bajo el meristemo se mantuvo la franja de células con taninos condensados que separa el tejido de la cofia en degeneración del resto del embrión.

Cabe señalar que tanto en ANA/BA como en 2,4-D/K las yemas apicales formadas tuvieron la clásica apariencia de un domo meristemático con primordios foliares, donde las células apicales y subapicales presentaron una menor acumulación de material granular que lo observado en la protodermis. Usualmente se encontraron traqueidas diferenciadas asociadas a la base de esta estructura aunque no se relacionaron al cilindro vascular. Así mismo se observó la formación de dos columnas de células hacia el centro de la estructura ya sea con vacuolas muy grandes que le dieron la apariencia de estar vacías, o llenas de material amorfo, probablemente taninos.

#### 2,4-D/K

La apariencia de las células del mesófilo de los cotiledones variaron ligeramente con respecto a la posición del cotiledón sobre el medio durante el cultivo. En el cotiledón más alejado al medio se observó que este tejido tuvo un arreglo más laxo y desordenado que en el

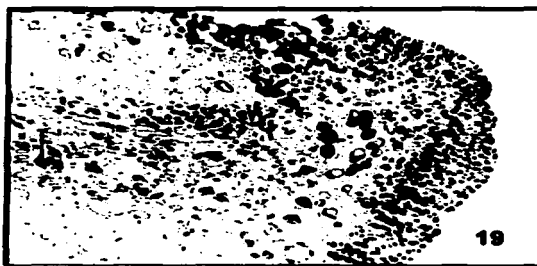


Fig. 19. Corte longitudinal de un cotiledón a los 30 días de cultivo en 2,4-D/K mostrando la formación de una amplia zona meristemática en su ápice.

cotiledón en contacto con el medio; al parecer el aumento en la longitud del primero se debió a un aumento en la longitud de las células y de los espacios intercelulares más que a un aumento en el número de células. Al igual que en ANA/BA, se observó una fuerte acumulación de taninos en la epidermis y el mesófilo en contacto directo con el medio. Las únicas regiones que tuvieron una apariencia compacta, así como actividad meristemática, correspondieron a las regiones meristemáticas en los ápices de los cotiledones (Fig. 19). Así mismo, se observó el desarrollo de meristemoides intercotiledonarios.

En el hipocotilo, al igual que en ANA/BA, las regiones meristemáticas en la SCM originaron nódulos grandes, a partir de los cuales iniciaron su desarrollo meristemos apicales (Fig. 20-A); cabe señalar que en muchas de estas estructuras se acumuló una gran cantidad de taninos en las células más externas (Fig. 20-B). Los primeros brotes diferenciados con primordios foliares se encontraron en las superficies laterales y más alejadas. En la mayoría de estas estructuras la epidermis pareció participar activamente en donar células tanto a la superficie como al cuerpo mismo; sin embargo, se encontraron evidencias de protuberancias nodulares, cuyo origen pareció ser más interno, que rompieron la epidermis al emerger. Se identificaron también algunas estructuras con un arreglo celular concéntrico en el parénquima asociado al haz vascular.



Fig. 20. Corte longitudinal de hipocotilo a los 30 días de cultivo en 2,4-D/K. (A) Formación de yemas (flechas) a partir de protuberancias nodulares, SCM; (B) Zonas meristemáticas (flecha) y protuberancias nodulares (pn) en la superficie del embrión cercana al meristemo radicular.



Se observó con regularidad el desarrollo del meristemo apical del tallo del embrión, el cual en esta fecha presentó al menos 6 hojas largas, con inicios de un haz vascular diferenciado, así como la elongación del tallo.

#### Cuarenta y cinco días de cultivo

En esta etapa, los explantes incrementaron considerablemente su grosor y aquellos que formaron estructuras adventicias las presentaron usualmente en los ápices de los cotiledones, sobre las superficies laterales del hipocotilo así como en las más alejadas del medio donde los brotes formados presentaron un mayor crecimiento. En las superficies en contacto con el medio se observó la aparición de algunos brotes, aunque por lo regular se obtuvo la formación de protuberancias nodulares, o masas irregulares de células compactas. Los explantes que no formaron brotes usualmente presentaron un tejido muy engrosado, de apariencia hiperhidratada, aunque comúnmente mantuvieron una coloración verdosa en el hipocotilo y cotiledones.

#### ANA/BA

A los 45 días de cultivo, los embriones de este tratamiento presentaron un respuesta más extendida. En cortes realizados se evidenciaron meristemos, yemas apicales y brotes con múltiples hojas formados a partir de las regiones epidérmicas y subepidérmicas del embrión, las cuales conservaron aparentemente la epidermis del explante (Figs. 21- A, 21-B y 21- E), así como a partir del parénquima asociado al tejido vascular tanto en los cotiledones como en el hipocotilo (Fig. 21-F); sin embargo, también se encontraron evidencias de la emergencia de primordios de brotes o protuberancias nodulares a través de la epidermis (Fig. 21-c y 21-D), que provocaron la ruptura de ésta, los cuales parecen haber tenido un origen en una región más profunda del explante. Ambos mecanismos de emergencia de los brotes han sido descritos para diferentes sistemas de cultivo.

En general los brotes formados presentaron el desarrollo *de novo* de traqueidas, que no parecieron unirse o relacionarse con el haz vascular principal del embrión, excepto en los

cotiledones donde se encontró que la mayoría de los brotes adventicios formados en el ápice presentaron conexiones con el haz vascular de este órgano (Fig. 21-E). Cabe señalar que también se registró la formación de protuberancias nodulares grandes, usualmente en la SCM, a partir de los cuales se inició la diferenciación de algunos meristemos apicales (Fig. 21-B).

Por lo regular el meristemo apical del tallo formó uno o más brotes, que usualmente presentaron tejido vascular (diferenciación de traqueidas); por su parte, las células zona del meristemo radicular exhibieron una enorme actividad, muchas protuberancias nodulares y meristemoides se desarrollaron a partir de esta parte del explante. La franja de células con taninos condensados que separa la radícula en degeneración del resto del tejido se mantuvo considerablemente gruesa (Fig. 21-H).

#### 2,4-D/K

Los embriones de este tratamiento si bien presentaron el desarrollo de brotes adventicios, éstos se formaron en un número notoriamente reducido, con frecuencia a partir de nódulos grandes y principalmente en las superficies laterales del embrión que no estuvieron en contacto directo con el medio durante el cultivo o a partir del ápice de los cotiledones. Sin embargo, en muchos de los embriones se observó la disgregación del córtex, las células se separaron mucho unas de otras y el espacio entre ellas se llenó de un material extracelular amorfo, formado principalmente por polisacáridos insolubles (Fig. 21-G). Los meristemoides formados en estos tejidos se encontraron usualmente muy aislados unos de otros y rodeados de este material, así como por células que acumularon una gran cantidad de taninos condensados. Sería importante señalar que en los explantes que en esta fecha no formaron brotes, presentaron una estructura muy similar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

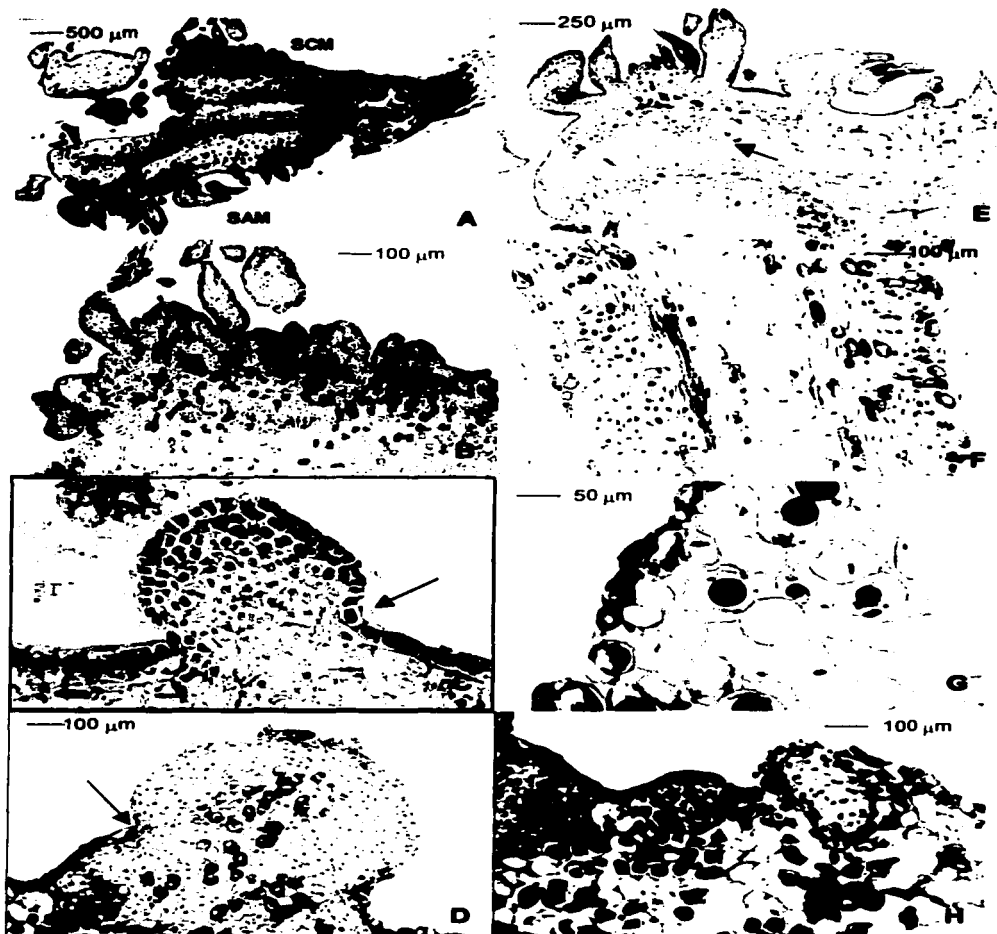


Fig. 21. 45 días de cultivo. (A-F y H: ANA/BA). (A) Brotación múltiple, mayor desarrollo en aquellos en la SAM; (B) Aumento del hipocótilo de la SCM; (C) y (D) Protuberancias nodulares que emergen rompiendo la protodermis principal del cotiledón (flecha); (E) Aumento de un cotiledón con brote adventicio en la SAM; note la conexión del brote con el haz vascular principal del cotiledón (flecha); (F) Formación de meristemoides en el parénquima asociado a los haces vasculares; (G) 2,4-D/K. Desarrollo exagerado de matriz extracelular en el hipocótilo; (H) Meristemoides rodeados por células con taninos; córtex totalmente desorganizado.

### 90 días de cultivo

Los explantes que dieron lugar a estructuras presentaron en su superficie yemas y brotes en diversos estados de desarrollo, usualmente con múltiples hojas. En 2,4-D se observó la elongación del tallo de uno o más brotes, mientras que en ANA/BA, la mayoría presentaron poco alargamiento (Fig. 22).

Fig. 22. Corte longitudinal de un brote en el hipocotilo a los 90 días de cultivo. La protodermis del explante sigue intacta y parece continua con la epidermis del brote. Existe una aparente prolongación del eje vascular del brote (flecha) hacia el explante pero este no se une al eje vascular principal.

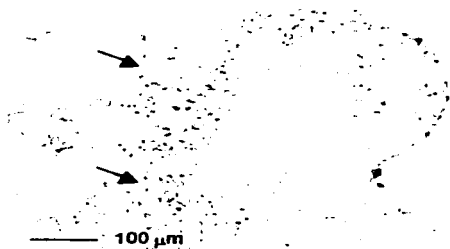
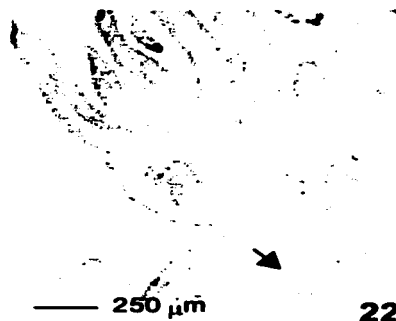


Fig. 23. Corte longitudinal del hipocotilo a los 90 días de cultivo. Las flechas señalan rastros de la porción basal de los brotes. Asimismo se observa el gran tamaño de las vacuolas de las células del córtex que no formaron parte de las estructuras.

Estructuralmente, en ambos tratamientos se observó que la protodermis usualmente seguía intacta, con inclusiones, por lo cual la forma general del embrión seguía manteniéndose. Sin embargo, el córtex ya presentó diversos estados de degeneración; la mayoría de las células estaban muy separadas unas de otras, tenían grandes vacuolas y muchas acumularon taninos aunque en algunas se observó la formación de cuerpos

lipídicos. En ANA/BA, en el córtex se observó lo que serían rastros de la porción basal de los brotes y de sus haces vasculares (Fig. 23), aunque no se observó que éstos se asociaran a los haces vasculares principales del explante, excepto en el cotiledón.

**Cuadro 3. Resumen de las observaciones estructurales sobre la ontogenia de los brotes.**

Tiempo de cultivo	TRATAMIENTOS	
	ANA/BA	24-D/K
3 días	<p><b>COTILEDONES:</b> pocos cambios. Consumo del material de almacenamiento</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> disminución de inclusiones celulares. Ligero engrosamiento.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> aumento notorio del volumen de las células, incremento de los espacios intercelulares.</p> <p><b>MA:</b> sin cambios aparentes</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> ligero engrosamiento, aún con abundante material de almacenamiento.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> ligero incremento en el tamaño de las células del córtex; disminución de inclusiones celulares.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> alta actividad meristemática de parénquima asociado al MR. Inicia la desorganización de la cofia.</p> <p><b>MA:</b> se registran pocas mitosis.</p>
6 días	<p><b>COTILEDONES:</b> acumulación de material en la protodermis de todo el embrión. Actividad mitótica de la hipodermis y en células provasculares.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> divisiones periclinales en algunas regiones de la protodermis. Intensa actividad mitótica en 1er y 2do estrato de células del córtex.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> alta actividad meristemática de parénquima asociado al MR. Acumulación de taninos en cofia y células que rodean al MR.</p> <p><b>MA:</b> divisiones anticlinales en capa externa, peri y anticlinales en el resto.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> similar a ANA/BA. Las células del mesófilo con vacuolas grandes, incrementan espacio intercelular.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> mayor acumulación de taninos en células en contacto con el medio. Divisiones en células subepidérmicas; formación de pilas de 4 a 6 células.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> desarreglo generalizado de las células</p> <p><b>MA:</b> crecimiento del domo apical.</p>
10 días	<p><b>COTILEDONES:</b> células del mesófilo con vacuolas y espacios intercelulares grandes. Pequeños grupos de células de apariencia meristemática en los cotiledones alejados del medio de cultivo.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas, así como agrupaciones de 3 a 4 células en la hipodermis, más abundante en la SCM.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> MR rodeado en su porción basal por células que acumulan taninos. La cofia continúa su disgregación.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> mesófilo similar ANA/BA</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> presenta abuitamientos. Células del córtex desarregladas y con vacuolas grandes, excepto bajo la protodermis donde toman una disposición ordenada.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> similar a ANA/BA</p> <p><b>MA:</b> ligero incremento de tamaño.</p>

MA: meristemo apical; MR: meristemo radicular; SAM: superficie alejada del medio durante el cultivo; SCM: superficie en contacto con el medio durante el cultivo; SL: superficies laterales del explante con respecto a su posición sobre el medio de cultivo.

**Cuadro 3. Resumen de las observaciones estructurales sobre la ontogenia de los brotes (cont).**

Tiempo de cultivo	TRATAMIENTOS	
	ANA/BA	2,4-D/K
12 días	<p><b>COTILEDONES:</b> poca actividad mitótica; agrupaciones de 3-4 células en superficies laterales.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> ondulaciones en la superficie, especialmente en la superficie más cercana al MR.</p> <p><b>SAM:</b> nódulos o protuberancias por divisiones periclinales y anticlinales del córtex y la protodermis.</p> <p><b>SCM:</b> zonas meristemáticas (2-3 estratos celulares)</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> mitosis en el ápice de los cotiledones, bajo los cuales se encontraron células que acumulan taninos.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> <i>SCM:</i> zonas meristemáticas (2-3 estratos de células) originadas por divisiones en la protodermis y córtex. Agrupaciones de células meristemáticas en las regiones intercotiledonarias.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> mitosis en células que rodean al MR; agrupaciones de 3-4 células en las SL del embrión.</p>
14 días	<p><b>COTILEDONES:</b> considerable actividad mitótica; células del mesófilo se organizan en zonas meristemáticas de 2-4 células de grosor bajo la protodermis. Acumulación de gránulos de polisacáridos insolubles en capas externas.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> células de apariencia meristemática cerca de los cotiledones y en regiones intercotiledonarias; así como en el parénquima asociado a los haces vasculares.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> poca actividad mitótica; cotiledón más corto en contacto con el medio.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> formación de nódulos y MA's bien diferenciados en las SL y SAM; la protodermis forma parte de las estructuras.</p>
16 días	<p><b>COTILEDONES:</b> acumulación de taninos en células de la SCM. En los ápices se forman nódulos y MA's con primordios foliares.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> <i>SCM:</i> formación de estratos de 8-10 células de grosor bajo la protodermis de apariencia meristemática que originan abultamientos. <i>Córtex interna:</i> agrupaciones de 3-4 células y meristemoides en la zona de transición entre el hipocotilo y la radícula. Meristemoides intercotiledonarios con traqueidas. <i>SAM:</i> poca actividad, se forman pequeñas agrupaciones de células en la subepidermis.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> la actividad mitótica se centra en la SCM, aunque hay poca respuesta.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> formación de nódulos en la SCM, en la SAM y en SL poco abundantes, usualmente en la hipodermis aunque también se forman en el córtex interno. Nódulos tienen traqueidas asociadas en su porción basal formadas <i>de novo</i>.</p> <p><b>MA:</b> brote apical bien desarrollado.</p>

MA: meristemo apical; MR: meristemo radicular; SAM: superficie alejada del medio durante el cultivo; SCM: superficie en contacto con el medio durante el cultivo; SL: superficies laterales del explante con respecto a su posición sobre el medio de cultivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 3. Resumen de las observaciones estructurales sobre la ontogenia de los brotes (cont).**

Tiempo de cultivo	TRATAMIENTOS	
	ANA/BA	2,4-D/K
22 días	<p><b>COTILEDONES:</b> zonas meristemáticas, de 3-4 células de espesor en la superficie abaxial y apical, con traqueidas en la parte más interna. Células del córtex presentaron vacuolas grandes.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> meristemoides en el parénquima asociado a los haces vasculares; <i>SL</i>: se forman MA's con primordios foliares. Córtex formado por tejido muy laxo.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> importante actividad mitótica en el parénquima que rodea al MR.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> crecimiento diferencial de cotiledones producto del alargamiento de las células. Las pocas regiones compactas corresponden a zonas meristemáticas usualmente del ápice.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> actividad mitótica considerable en SCM, con la formación de algunos estratos celulares más gruesos. Formación de brotes.</p>
30 días	<p><b>COTILEDONES:</b> células de la protodermis muy delgadas; formación de zonas meristemáticas amplias (5 o más estratos) al costado de los explantes y MA's en el ápice.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> <i>SCM</i>: formación de protuberancias nodulares grandes de células con apariencia meristemática; meristemoides en el interior del córtex y MA's en la SAM.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> meristemoides en el parénquima circundante al MR.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> meristemoides y MA's en el ápice; meristemoides con forma de domo en la zona intercotiledonaria</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> <i>SCM</i>: protuberancias nodulares grandes a partir del cual se inició el desarrollo de MA's. <i>SAM</i> y <i>SL</i>: brotes con primordios foliares y hojas. Protuberancias nodulares que rompen la protodermis para emerger.</p> <p><b>MA:</b> Brotes bien desarrollados.</p>
45 días	<p><b>COTILEDONES:</b> formación de nódulos, MA's con primordios foliares y brotes con conexión al haz vascular del cotiledón.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> formación de las diferentes estructuras, usualmente con la participación de la protodermis y el córtex aunque se encontraron nódulos que rompen la superficie. <i>SCM</i>: diferenciación de MA's a partir de protuberancias nodulares.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> gran cantidad de protuberancias nodulares y meristemoides de la zona del MR.</p> <p><b>MA:</b> desarrollo de uno o más brotes.</p>	<p><b>COTILEDONES:</b> mesófilo sumamente laxo, pocas zonas meristemáticas en los ápices.</p> <p><b>HIPOCOTILO:</b> se forman pocos meristemoides y MA's a partir de la hipodermis; la mayoría de las células del córtex tienen vacuolas grandes y están muy separadas entre sí por material extracelular, aparentemente una pared muy gruesa. Células con taninos repartidos entre el córtex.</p> <p><b>RADÍCULA:</b> deshecha. Abundante acumulación de taninos en las regiones basales.</p>

MA: meristemo apical; MR: meristemo radicular; SAM: superficie alejada del medio durante el cultivo; SCM: superficie en contacto con el medio durante el cultivo; SL: superficies laterales del explante con respecto a su posición sobre el medio de cultivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

Han sido pocos los estudios acerca de la ontogenia de las estructuras adventicias formadas *in vitro*, si se comparan con el número de especies que han sido regeneradas mediante estas técnicas. En el género *Pseudotsuga*, sólo se ha trabajado con *P. menziesii*, y es quizás una de las especies de coníferas para la cual se han desarrollado una mayor cantidad de protocolos de regeneración, ya sea vía organogénesis o embriogénesis somática (Durzan y Gupta, 1987), debido a su importancia económica a nivel mundial. Sin embargo, respecto a la formación de brotes adventicios, únicamente se han reportado dos trabajos que tratan acerca del desarrollo ontogénico de estas estructuras para *P. menziesii* (Cheah y Cheng, 1978; Kirby y Schalk, 1982). Este sería el primer estudio acerca de la ontogenia de brotes adventicios formados a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros completos de *P. macrolepis*.

La respuesta morfogénica de un explante depende en gran medida de las condiciones del cultivo, en particular del tipo y de la concentración de los reguladores de crecimiento; aunque ésta también es altamente dependiente de factores intrínsecos al explante mismo, como lo son su genotipo y estado fisiológico (incluyendo edad fisiológica y ontogénica); el tipo de órgano o tejido que sirve como explante; el tamaño; la estación del año durante el cual fue recolectado y la calidad general de la planta madre (Thorpe y Patel, 1984; Ahuja, 1993). En el caso particular de *P. macrolepis*, se emplearon embriones maduros como explantes ya que han sido los que han presentado una mayor receptividad al manejo *in vitro* (Galindo-Flores, datos no publicados); sin embargo, esta elección pudo ser un factor que influyó sobre la variabilidad en los resultados observados; ya que estos explantes (embriones completos) fueron el producto de una fecundación por polinización abierta, no existe una uniformidad genética que pudiera presuponer uniformidad en cuanto a las respuestas que se manifiestan (Vogelmann *et al.*, 1984)

Al igual que en los estudios anteriores con *P. macrolepis* (García-Campusano, 1999; Monjarás-González, 2001), se encontró que las diferencias entre los tratamientos con reguladores de crecimiento eran de orden cualitativo. Es decir, los embriones tratados con



ANA/BA formaron yemas y brotes, aparentemente en mayor número y en conglomerados cuya elongación fue más lenta y su sobrevivencia más baja. Por su parte, en los tratamientos con 2,4-D/K el número de brotes fue generalmente menor y su crecimiento fue más rápido, lo cual permitía su individualización en un tiempo más corto. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por otros autores para diferentes coníferas, específicamente para los cultivos de *P. menziesii* (Cheng, 1977), *Pinus strobus* (Flinn *et al.*, 1986), *Picea rubens* (Lu *et al.*, 1991), *Pinus banksiana* (Harry y Thorpe, 1994), *Pinus elliottii* (Sen *et al.*, 1994) y *Picea chihuahuana* (López-Escamilla, 2000), donde documentan la formación de un mayor número de brotes por embrión en los explantes tratados con BA que con K.

En general, el proceso de formación de brotes siguió un patrón similar a lo observado por otros autores; sin embargo, la distribución espacial y la asincronía temporal del proceso, así como la vía de desarrollo que siguieron las células activadas por el tratamiento de inducción, presentó variaciones que no parecieron tener tanta relación con el tipo de reguladores de crecimiento empleados, como con la posición de las células con respecto al medio de cultivo. Estas observaciones parecen concordar con la hipótesis de que el establecimiento de gradientes hormonales y nutrimentales en el tejido del explante son un factor preponderante para el establecimiento de la competencia celular y de la posterior determinación (Yeung *et al.*, 1981; Joy-IV y Thorpe, 1999; Ziv, 1999). La respuesta se relacionó con la presencia de sitios particularmente "sensibles" a los tratamientos inductores; es decir, a ciertas zonas que aparentemente presentaron una predisposición para responder a los tratamientos, como: el meristemo apical del brote, el tejido intercotiledonario y posiblemente la protodermis.

Debido a que el proceso organogénico varió temporalmente entre los explantes, aún dentro de un mismo tratamiento, a nivel estructural, el desarrollo *in vitro* de brotes adventicios de *P. macrolepis* se separó en varias etapas, que se discutirán en orden cronológico (Fig. 24):

***Etapa 1 (0-5 días): Divisiones azarosas en el tejido***

La activación de la división celular fue la primera respuesta del explante al tratamiento inductor y contribuyó de manera importante al crecimiento generalizado y al posterior curvamiento del explante (además del crecimiento por aumento en el volumen celular), lo cual parece un evento común durante la micropropagación, ya que ha sido descrito por varios autores (Yeung, 1981; Flinn *et al.*, 1988; Kulchetscki *et al.*, 1995).

Por otra parte, se sabe que la reactivación del ciclo celular en células diferenciadas bajo la influencia de un estímulo externo, es un reflejo de su competencia mitótica y se cree que es un paso indispensable para que se presente el cambio de un tipo celular determinado a uno que permita la rediferenciación de la célula y el reinicio de la morfogénesis (Joy-IV y Thorpe, 1999; Ziv, 1999; Thorpe y Stasolla, 2001). Sin embargo, siguen sin esclarecerse del todo, que factores son los que establecen la competencia de una célula ya que las células en un cultivo varían en su capacidad de responder a la inducción.

Las hipótesis al respecto, parten del enunciado de que los tejidos empleados para iniciar un cultivo están constituidos por una población de células muy heterogénea tanto en su potencial de desarrollo como en su grado de organización, por lo cual pueden ser *permissivas* a la morfogénesis, o *inductivas*, dependiendo de sus antecedentes genéticos (Meins, 1986, George, 1993). Según evidencias relativamente recientes, en cultivos de capas delgadas de células de tabaco (Gilissen *et al.*, 1994), se relacionó la localización del sitio de origen de la mayoría de los brotes adventicios formados (epidermis y subepidermis), con la ploidía de las células constituyentes; en este caso aquellas con una ploidía normal de 2C presentaron una mayor competencia, ya sea que encontraran detenidas en un fase G1 o G2 del ciclo celular. La velocidad con la cual las células responden a las señales inductoras y reactivan su ciclo celular puede, por lo tanto, determinar el momento en el cual se inicia la determinación de las células y la posibilidad de éstas para desarrollarse.

Con respecto a esto, Street (1977 *vide* George, 1993), señala que de la población de células potencialmente competentes, aquellas que inician su desarrollo primero inhiben el desarrollo de células circundantes al tomar de ellas metabolitos esenciales; esto puede encontrar sustento en observaciones realizadas a partir de análisis citoquímicos que muestran una disminución más rápida de material de almacenamiento (almidones, lípidos y proteínas) de las células que no responden morfogénicamente (Patel y Berlín, 1983; Patel y Thorpe, 1984; Flinn *et al.*, 1989). Por su parte, otros autores plantean que aquellas células que se inducen primero inhiben el desarrollo de las células circundantes a través de la liberación de compuestos reguladores del crecimiento (George, 1993).

#### *Etapa 2 (4-6 días): Localización de las divisiones celulares*

En los cultivos de *P. macrolepis*, resultó difícil establecer a partir de que estrato celular se inició la respuesta a la inducción, si de la protodermis o de la hipodermis, ya que en muchos de los casos se encontró evidencias de que ambas participaron simultáneamente en el desarrollo de los meristemas, regiones mersitemáticas, nódulos y yemas; por lo cual se propone, al igual que varios autores, un origen multicelular para la mayoría de los brotes adventicios obtenidos.

La concentración de las divisiones celulares en los estratos proto e hipodérmicos del explante ocurre dentro del mismo período que ha sido reportado por otros autores: entre los 3 y 9 días de exposición a las citocininas y generalmente en la superficie en contacto con el medio (Cheah y Cheng, 1978; Yeung *et al.*, 1981; Aitken-Christie *et al.*, 1982; von Arnold y Grönroos, 1986; Wagley *et al.*, 1987); este fenómeno se ha relacionado a una activación mitótica orientada hacia la morfogénesis, aunque no se ha logrado establecer si en este período las células se encuentran ya determinadas (Flinn *et al.*, 1988; Joy-Iv y Thorpe, 1999), aunque es posible sugerir que éstas son competentes. A partir de ellas se ha observado el desarrollo de promeristemoides (Villalobos *et al.*, 1985; Flinn *et al.*, 1988; Saravitz *et al.*, 1991 *vide* Kulchetscki *et al.*, 1995; Kulchetscki *et al.*, 1995; López-Escamilla *et al.*, 2000; Pelletier y Laliberté, 2000), o de regiones más amplias de células de apariencia

meristemática (centros meristemáticos) (Yeung *et al.*,1981; von Arnold y Grönroos, 1986; Kulchetscki *et al.*, 1995).

A diferencia de lo observado en el cultivo de cotiledones de *P. menziesii*, donde el origen de las estructuras es totalmente hipodérmico y los brotes emergen a la superficie rompiendo la epidermis (Cheah y Cheng, 1978; Kirby y Schalck 1982), la protodermis de los embriones de *P. macrolepis* participa activamente en el proceso organogénico, formando parte de las estructuras en desarrollo, creciendo mediante divisiones anticlinales, tal como ha sido observado en los sistemas de micropropagación propuestos para *Pinus radiata* (Yeung *et al.*,1981; Villalobos *et al.*,1985), *Picea abies* (von Arnold y Grönroos, 1983), *Pinus strobus* (Flinn *et al.*, 1988), *Abies fraserii* (Saravitz *et al.*, 1991 *vide* Kulchetscki *et al.*, 1995) y *Abies amabilis* (Kulchetscki *et al.*, 1995).

Por otra parte, las células protodérmicas de *P. macrolepis* presentan también divisiones periclinales con lo cual participan agregando células a la región cortical y a las regiones meristemáticas en formación. Aunque este tipo de actividad se ha observado con frecuencia en especies como *Begonia rex*, *Crassula multicava*, *Dionaea muscipula*, *Nicotiana tabacum* y *Saintpaulia ionantha* (Popham, 1966 *vide* Jansson y Bornmann, 1981), se ha reportado pocas veces en coníferas; solamente en cultivos de acículas de *Picea abies* (Jansson y Bornmann, 1981), en los cotiledones y a partir de células del sistema estomatal inmaduro de acículas de *Pinus radiata* (Aitken-Christie *et al.*, 1982; Villalobos *et al.*,1985) y en cultivo de cotiledones de *Pinus strobus* (Flinn *et al.*,1988).

Aunque este tipo de respuesta pudo verse estimulada por el tratamiento inductor, también es posible que se haya presentado por una predisposición del tejido a responder meristemáticamente; en el único estudio que se ha reportado acerca de la embriogénesis cigótica en *Pseudotsuga* (Allen, 1947a y b), se encontró que los embriones no tienen una epidermis en el sentido tradicional ya que las células que la conforman son altamente meristemáticas y presentan tanto divisiones periclinales como anticlinales.

El hecho de que en los cultivos de cotiledones de *P. menziesii* la epidermis no participara en el proceso organogénico, podría deberse a una situación endógena del explante, ya sea que en esta especie las células epidérmicas no posean la capacidad de responder organogénicamente y que esta capacidad no se logra inducir mediante los tratamientos propuestos en el sistema de cultivo; o que las células perdieron su competencia debido a que los cotiledones empleados ya presentaban cierto grado de madurez (2-5 semanas de germinación).

Vale la pena enfatizar el hecho de que la mayor parte de la respuesta morfogénica se inició en el hipocotilo, desde la región que rodea al meristemo radicular a la subcotiledonaria. Lu *et al.* (1991) reportaron la formación masiva de brotes a partir del hipocotilo de embriones de *Picea rubens*, mientras que en *Picea sitchensis* y *Pinus contorta*, se reportó este tipo de respuesta de manera ocasional (Webb y Street, 1977 *vide* Lu *et al.*, 1991); sin embargo, estos autores no hicieron un seguimiento histológico del proceso ontogénico. Por este motivo, este tipo de respuesta es difícil de comparar con lo observado por otros autores, ya que la mayoría sólo usaron los cotiledones en diferentes grados de maduración como explantes (Cuadro 2). De los trabajos en coníferas donde se empleó al embrión completo, sólo von Arnold y Grönroos (1986) describieron el desarrollo de brotes a partir de meristemoides y centros meristemáticos del hipocotilo del embrión; Nour *et al.* (1993), por su parte, encuentran respuesta únicamente a partir del meristemo apical del embrión, a partir del cual se generan dos brotes; mientras que Pelletier y Laliberté (2000) y López-Escamilla *et al.* (2000) mencionaron la formación de yemas y brotes solamente a partir de los cotiledones, del tejido intercotiledonario y de las porciones del hipocotilo más cercana a los mismos.

En embriones maduros de *P. macrolepis*, la respuesta de los cotiledones fue tardía, lo cual sugiere que se requieren tiempos de inducción más prolongados para que se presente una actividad morfogénica, lo cual fue observado también por López-Escamilla (2000). En ANA/BA, una considerable actividad mitótica se hizo evidente a partir de los 14 días de cultivo, mientras que en 2,4-D/K se inició entre los 22 y 30 días y se vió limitada al ápice

de los cotiledones, lo cual correspondió a los sitios de actividad mitótica más prolongada en este tipo de órganos, debido a que el resto exhibió una pérdida de competencia por la maduración de los tejidos (Jansson y Bornman, 1981; Ellis y Bilderback, 1989; Saborio *et al.*, 1997).

### ***Etapas 3a (6-10 días): Zonas meristemáticas***

Las zonas meristemáticas, según la descripción realizada por von Arnold y Grönroos (1986), se refiere a un tipo de organización celular amplia, usualmente iniciada a partir de la protodermis y regiones hipodérmicas, probablemente derivada de la activación mitótica de varias células contiguas. Esto no coincide con la descripción "clásica" de los meristemoides y estructuras subsecuentes planteada por otros autores (Thorpe, 1980 *vide* Joy-IV y Thorpe, 1999), quienes sugirieron que se originan a partir de la división de una sola célula. Según von Arnold y Grönroos (1986) la formación de las zonas meristemáticas se debe a la exposición prolongada a citocininas; al parecer, disminuir el tiempo de exposición a BA promueve la formación directa de brotes, lo cual fue la respuesta que se obtuvo en el presente trabajo en los tejidos más alejados del medio.

El desarrollo de estas zonas meristemáticas quizás sea la evidencia más notoria de la influencia de los reguladores de crecimiento y de la cercanía al medio de cultivo, sobre la activación de las células del explante y el posterior desarrollo morfogénético; las zonas meristemáticas se formaron generalmente en la superficie en contacto con el medio de cultivo y a medida que aumentó la distancia de los estratos celulares con respecto al medio, este tipo de organización celular fue reemplazada por la formación de meristemoides. Esto sugiere la formación de un gradiente a través del tejido, que va de una mayor concentración de reguladores de crecimiento en las zonas de contacto explante-medio a una de menor concentración en las zonas más alejadas. Lo cual parece congruente con la hipótesis de que las citocininas, al menos la BA, como fue demostrado en explantes de *Picea abies* y *Pinus sylvestris*, se distribuye a través del tejido por difusión pasiva (Vogelmann *et al.*, 1984).

A diferencia de lo observado por Pelletier y Laliberté (2000) en cultivos de embriones maduros de *Pinus banksiana*, donde las células en contacto con el medio de cultivo proliferaron pero no dieron lugar a la formación de órganos, en *P. macrolepis*, los estratos externos de estos centros meristemáticos desarrollaron meristemas y yemas apicales. Otros autores han obtenido este tipo de organización celular, ya sea a partir de cultivos de cotiledones como Yeung *et al.*, (1981) y Aitken-Christie *et al.*, (1982) para *Pinus radiata*; von Arnold y Grönroos (1986) para *Picea abies* y Kulchetscki *et al.*, (1995) para *Abies amabilis*.; o a partir de cultivo de epicotilos como Rumary *et al.*,(1986) para *Picea glauca* y *Picea mariana*. Sin embargo, para *P. macrolepis* el desarrollo de los brotes se presentó tardíamente, usualmente después de que los embriones fueran transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento. Esto sugiere la posibilidad de que las concentraciones de reguladores de crecimiento y nutrimentales fueran supra-óptimas en los estratos celulares más cercanos al medio, por lo cual el desarrollo de brotes se vio inhibido; no obstante, su desarrollo después del subcultivo también demostró que estas células ya se encontraban determinadas caulogénicamente (Meins, 1986; Lyndon, 1990).

En embriones tratados con 2,4-D/K y en algunos de ANA/BA, estas zonas dieron origen además a nódulos grandes de células meristemáticas; a partir de las células superficiales de estas estructuras se obtuvo la formación de varios brotes, mientras que de las células ubicadas hacia el centro del mismo, tendieron a formar vacuolas grandes y a llenarse de taninos. Pelletier y Laliberté (2000) describieron la formación de nódulos parenquimatosos a partir del tejido en contacto con el medio, sin embargo no mencionaron su potencial meristemático.

### *Etapa 3b (6-14 días): Agrupaciones celulares y promeristemoides*

Las agrupaciones celulares (clusters) aparentemente presentaron una forma de activación mitótica y una organización distinta a lo observado para centros meristemáticos, ya que presentaron una distribución dispersa en el tejido. Al comparar el tiempo de formación de las agrupaciones celulares con lo observado en cultivos de *Pinus radiata* (Yeung *et al.*, 1981; Villalobos *et al.*, 1985), *Picea glauca*, *Picea mariana* (Rumary *et al.*, 1986) y *Pinus strobus*

(Flinn *et al.*, 1988 y 1989), donde su desarrollo se inició entre los 3 y 5 días, se puede inferir que *P. macrolepis* requiere tiempos de inducción más prolongados, especialmente en los cotiledones, donde se vuelve comparable con lo observado para *Picea chihuahuana* (López-Escamilla *et al.*, 2000) y para *Abies fraseri* (Saravitz *et al.*, 1993 *vide* Kulchetscki *et al.*, 1995).

Flinn *et al.* (1988) relacionaron la presencia y desarrollo de estas agrupaciones celulares con la competencia organogénica de un tejido; de hecho plantearon la posibilidad de que estas agrupaciones correspondan a “células blanco”, relativamente indiferenciadas en el tejido embrionario predispuestas a la división como parte del proceso de germinación y que dan origen a los meristemoides.

En este trabajo no fue posible relacionar la formación de estos agregados celulares al desarrollo de meristemoides, ya que por lo regular no se encontraron estructuras intermedias, de 4-6 células o los promeristemoides reportados en otros trabajos (Villalobos *et al.*, 1985; Flinn *et al.*, 1988 y 1989). De hecho, los promeristemoides se identificaron a los 6 días de cultivo, en el tratamiento de ANA/BA, en pocas ocasiones, a partir de células del córtex del hipocotilo, así como de la hipodermis de la interfase hipocotilo-radícula, lo cual se aparta del patrón descrito por los autores antes mencionados. Todo esto sugiere varias posibilidades: primeramente, que existe una gran variabilidad en la capacidad de respuesta de los explantes; en seguida, que las fechas en las cuales se realizaron los cortes durante estas etapas iniciales (0-10 días) del cultivo, quizás debieron ser más cercanas entre sí; y finalmente, que en *P. macrolepis*, bajo las condiciones de cultivo propuestas, la formación de estructuras no sigue una ruta de desarrollo en el cual intervengan los promeristemoides. Otro punto a señalar es que la mayor parte de la respuesta organogénica se origina en el hipocotilo, zona donde pocos de los autores que han cultivado embriones completos han mencionado su presencia (von Arnold y Grönroos, 1986; von Arnold y Hawes, 1989; Pelletier y Laliberté, 2000). De hecho, sólo Saravitz *et al.* (1991 *vide* Kulchetscki *et al.*, 1995) lo reportan para cultivos de embriones de *Abies fraseri*.



#### ***Etapa 4 (a partir de los 12 días): Meristemoides***

Por lo general los meristemoides se formaron a partir de células localizadas ligeramente alejadas del medio de cultivo (usualmente no en contacto directo con él, aunque no se excluye esta posibilidad), en las superficies laterales o en las más distantes, así como a partir de células intercotiledonarias. Es muy posible que la formación de estas estructuras responda al establecimiento de un gradiente en el tejido (de citocininas entre otros) como ha planteado Thorpe (1980 *vide* Joy-Iv y Thorpe, 1999) y von Arnold y Grönroos (1986), y que se hayan originado por la activación de una o muy pocas células iniciales, aunque posteriormente indujeran a células circundantes a participar en el desarrollo de la estructura (por ejemplo células protodérmicas), dando lugar a la formación de dominios organogénicos como fue descrito por Patel y Berlín (1983).

El origen de la mayor parte de los meristemoides fue protodérmico e hipodérmico, lo cual corresponde a las observaciones de la gran mayoría de los autores acerca del origen de estas estructuras; además una parte importante de ellos se desarrollaron a partir de células en el tejido intercotiledonario. Esta capacidad ha sido demostrada en otros estudios, por ejemplo con *Picea engelmannii* (Patel y Thorpe, 1986 *vide* Pelletier y Laliberté, 2000) así como en *Picea glauca* y *Picea mariana* (Rumary *et al.*, 1986) y *Pinus banksiana* (Pelletier y Laliberté, 2000). Según Rumary *et al.*, (1986) esta respuesta se debe a la recanalización de células totipotenciales del parénquima hacia una nueva ruta de diferenciación; aunque existe también la propuesta de que estos sitios se encuentran predispuestos a la organogénesis, por lo cual es posible que expresen su estado de competencia con mayor facilidad ante un estímulo inductor (Pelletier y Laliberté, 2000).

Thorpe (1980 *vide* Joy-Iv y Thorpe, 1999) menciona que si bien la localización específica de los brotes y el tiempo en el cual se presentan es muy variable de un sistema de cultivo a otro, en general los estratos epidérmicos y subepidérmicos se mantienen como los principales tejidos a partir del cual se origina la respuesta morfogénica. Esto se ha constatado en prácticamente todos los trabajos, incluyendo el presente. Sin embargo, se identificaron meristemoides que aparentemente se originaron de células del córtex y del

parénquima asociado al cilindro vascular a partir de los 12-16 hasta los 30 días de cultivo, en embriones tratados con ANA/BA y con menor frecuencia en 2,4-D/K. Éstos se formaron principalmente en el hipocotilo, a lo largo del eje provascular, pero especialmente concentrados en el córtex que rodea al meristemo radicular. Lo anterior indica una gran susceptibilidad del explante al cultivo, especialmente hacia ANA/BA, lo cual podría ser una de las razones por la cual los explantes sometidos a esta combinación de reguladores de crecimiento desarrollan un mayor número de brotes. Este es un proceso que en general no se ha reportado para cultivos de coníferas, aunque hay que recalcar nuevamente que la mayoría de los cultivos estudiados a la fecha han sido de cotiledones, usualmente de plántulas que ya presentan cierto grado de diferenciación, por lo cual regiones distintas a la epidermis y subepidermis puede que muestren poca susceptibilidad a los tratamientos.

A medida que los meristemoides “maduraron” para originar meristemas, se encontraron traqueidas diferenciadas *de novo* asociadas a la región más cercana al córtex. Por medio de las observaciones histológicas no quedó claro si estas traqueidas se originaron al interior del meristemoide en desarrollo, como respuesta de las células al tratamiento inductor, en particular a la aplicación de auxinas (Burguess, 1985), o si la diferenciación obedeció al inicio de la formación de un haz vascular. Por otra parte, en estudios realizados en cultivo de callos de *Pelargonium*, la formación de traqueidas se asoció a las etapas tempranas del desarrollo de las yemas apicales, ya que al parecer los nódulos meristemáticos con traqueidas asociadas dieron lugar a la formación de brotes una vez que los callos se subcultivaron en medio sin hormonas (Chen y Galston, 1967; Cassells, 1979 *vide* George, 1993). De ser este el caso en los cultivos de *P. macrolepis*, la formación de traqueidas pudiera ser una señal de la determinación de la estructura hacia el desarrollo de una yema adventicia.

A los 90 días de cultivo, se observan extensiones de lo que podrían ser haces vasculares de los brotes en el interior del córtex del embrión, sin embargo, excepto en los cotiledones, este tipo de arreglo celular no parece dirigirse a los haces vasculares principales del

explante. No son muchos los autores que discuten si los brotes se unen vascularmente o no a sus explantes, exceptuando Rumary *et al.* (1986), quienes encontraron que en sus explantes (epicotilo) los brotes primarios formados a partir de la actividad de células intercotiledonarias sí se unen al sistema vascular principal, lo cual al parecer estimula su desarrollo; por otra parte, encontraron que los brotes secundarios que se formaron posteriormente no presentaron este tipo de conexiones.

Una importante cantidad de células que acumulan taninos se concentraron en la epidermis, alrededor de los haces vasculares y en las células del córtex que rodean a los meristemoides y centros meristemáticos; al parecer, éste es un fenómeno común durante el cultivo de coníferas (Cheah y Cheng, 1978; Harry y Thorpe, 1994; López-Escamilla, 2000) y se ha relacionado al proceso de maduración y a un estado avanzado de la diferenciación de los tejidos, aunque su síntesis puede también deberse a una respuesta del explante a las condiciones *in vitro*.

#### *Etapa 5 (a partir de los 14 y 22 días): Desarrollo de la yema adventicia*

El desarrollo de yemas fue asincrónico y de hecho no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos durante las primeras fases del cultivo, aunque las primeras yemas se formaron a partir de los 14 días en 2,4-D/K y de los 16 en ANA/BA. En la superficie en contacto con el medio el desarrollo de brotes fue a partir de los 22 en 2,4-D/K y entre los 30 y 45 días en ANA/BA, lo cual fue congruente con el hecho de que a los 30 días aún se encontraron meristemoides. Al parecer, los embriones tratados con BA requieren mayores tiempos de inducción, además de que este regulador o su efecto parece mantenerse activo en el tejido por un tiempo más prolongado; según lo reportado por López-Escamilla (2000) la BA induce la síntesis de proteínas a una tasa más lenta que la K, aumentando paulatinamente a lo largo del cultivo; mientras que la K induce rápidamente la síntesis protéica aunque ésta disminuye notoriamente a los 30 días de cultivo. Vale la pena recordar, que si bien ambos RC corresponden a la familia de las citocininas, éstas no son iguales ni cuantitativa ni cualitativamente en su acción, ni en la tasa en la cual son

metabolizadas por las plantas y que esto puede tener efectos particulares sobre la síntesis de proteínas (tasa y tipo) y la expresión génica.

La reducida respuesta, en cuanto a número de brotes, que se observó en los cultivos con 2,4-D/K pudo deberse a que la K por lo regular indujo un menor número de células que la BA; ya que esta última estimuló el desarrollo de meristemoides de una mayor variedad de tejidos; sin embargo, sería también importante recalcar el posible papel del 2,4-D, ya que siempre se ha considerado como un fuerte inductor del desarrollo de callo (George, 1993), mientras que en *Picea rubens* se reportó que su aplicación disminuía el número de embriones que respondían al tratamiento inductor (Lu *et al.*, 1991). Por otra parte, la falta de crecimiento de muchos de los brotes formados en ANA/BA pudo deberse a varios factores, entre los que destacan: la competencia entre los brotes por nutrientes, RC, etc; la síntesis de algún compuesto por los brotes “dominantes” que resulte inhibitorio para el desarrollo de otros brotes (George, 1993); el efecto de una exposición prolongada a la BA que se sabe tiende a producir brotes de crecimiento reducido, cuyo tamaño no mejora después de los subcultivos (Flinn *et al.*, 1986).

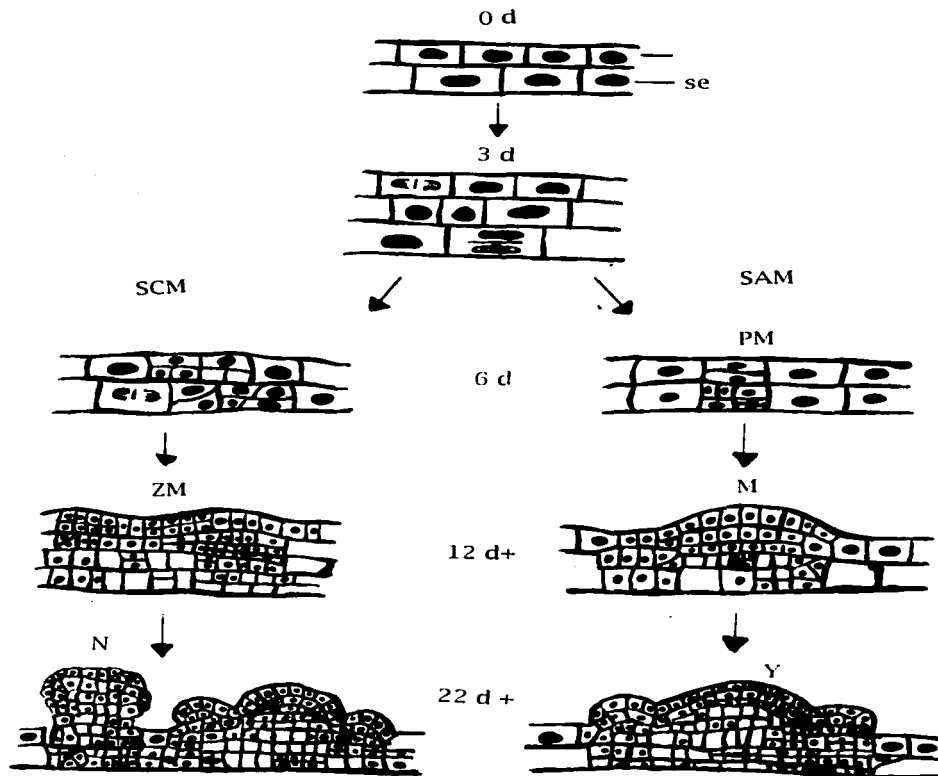
### ***Radícula***

El desarrollo de la radícula no se observó durante los cultivos, aunque si se registró una gran actividad mitótica y posteriormente meristemática a partir del córtex que rodea meristemo radicular. Al parecer ante el estímulo inductor, las células de esta zona, al ser altamente susceptibles a dividirse, expresaron su totipotencialidad redirigiendo su desarrollo para formar brotes en lugar de una raíz. Este sería el primer reporte para coníferas acerca de la formación *in vitro* de brotes adventicios a partir de esta región del embrión.

Por su parte, la cofia mostró señales de degeneración muy temprano en el cultivo, que inició con el alargamiento y la separación de las células y culminó con la acumulación de una gran cantidad de taninos. El crecimiento celular en cultivo es una característica que se le ha atribuido siempre a las auxinas (George, 1993), y existe la posibilidad de que el

alargamiento de las células respondiera a la presencia de este regulador; sin embargo, en trabajos previos (García-Campusano, 1999; Monjarás-González) este fenómeno también se reportó para aquellos embriones sometidos a tratamientos sin auxinas exógenas. Una explicación plausible a este fenómeno puede ser que el meristemo radicular de los explantes al no dar lugar a la radícula tampoco genera células que puedan destinarse a formar parte de la cofia y que por ello, ésta degenera. Según Allen (1947a), la cofia se origina a partir de la división de las células de la columna de la cofia las cuales, a su vez, se originan a partir de células del meristemo radicular.

Fig. 24 Esquema que resume las etapas implicadas en la formación de yemas en los embriones cultivados de *Pseudotsuga macrolepis* (las fechas señaladas corresponden a las observaciones realizadas en el hipocotilo).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Abreviaturas: M: meristemoide, N: protuberancia nodular; PM: promeristemoide; pr: protodermis; se: subepidermis; Y: yema apical; ZM: zona meristemática

## CONCLUSIONES

- Este es el primer estudio acerca de la ontogenia de brotes adventicios formados mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous.
- A través del análisis histológico, se confirmó que el desarrollo de los brotes fue adventicio y vía organogénesis directa, a partir de tejidos del hipocotilo, cotiledones y regiones intercotiledonarias.
- El desarrollo de estructuras se inició a partir de la protodermis y de los primeros dos estratos hipodérmicos, así como a partir del parénquima asociado a los haces vasculares y al meristemo radicular.
- El patrón de desarrollo fue similar a lo observado para otras especies; encontrándose de manera sucesivas las siguientes etapas: (a) 0-5 días: divisiones azarosas en el tejido; (b) 4-6 días: localización de las divisiones celulares; (c) 6-10: formación de zonas meristemáticas en la superficie en contacto con el medio; (d) 6-14 días: formación de agrupaciones celulares y promeristemoides; (e) a partir de los 12 días: desarrollo de meristemoides (superficies laterales y alejadas del medio); (f) a partir de los 14 y 22 días (en 2,4D/K y ANA/BA respectivamente): formación de yemas y desarrollo de brotes.
- La presencia de diferentes rutas morfogénéticas: la formación de zonas meristemáticas o meristemoides como origen de estructuras, se debió probablemente a la formación de gradientes en el tejido.
- Debido a que la mayoría de las estructuras se formaron mediante la participación de la protodermis y regiones hipodérmicas, se propone para ellas un origen multicelular.
- Al parecer, las células de los embriones de *P. macrolepis* son más sensibles a la BA que a la K; las diferencias observadas entre los tratamientos con respecto al número de

brotos se debió en parte al hecho de que en ANA/BA la formación de meristemoides se prolongó hasta los 30 días, e indujeron a células de la protodermis, hipodermis y tejido fundamental, tanto del hipocotilo como de los cotiledones; mientras que en 2,4-D/K esta respuesta fue más limitada. Cabe señalar, que este es el primer reporte para coníferas acerca de la formación *in vitro* de brotes adventicios a partir del tejido fundamental que rodea al meristemo radicular.

- Se podría recomendar empleo de la BA como regulador de preferencia para inducir la formación de brotes adventicios, si se estableciera un manejo que permitiera el alargamiento de los brotes formados, ya sea reduciendo los tiempos de exposición a la hormona o a través de la combinación con otras citocininas.
- Debido a la baja regeneración natural de *Pseudotsuga macrolepis* y a las dificultades para propagarla vegetativamente por otros medios, el cultivo de tejidos sigue presentándose como una alternativa importante para su producción. Estudios como el presente pueden contribuir generando información acerca del proceso de morfogénesis *in vitro*, así como esclarecer el porqué de la baja respuesta a las condiciones de cultivo y la falta de enraizamiento, para obtener una metodología que permita la formación de plántulas completas.



## PERSPECTIVAS

Los estudios histológicos han sido ampliamente utilizados en diversas áreas de investigación y en el caso de los estudios *in vitro*, han servido para comprender mejor las interacciones que se presentan entre el medio de cultivo y los explantes, que conducen a la morfogénesis. Sin embargo, aunque muchos trabajos presentan micrografías con las cuales demuestran la presencia de las estructuras que describen (llámese brotes, raíces o embriones), son considerablemente menos aquellos donde se busca describir los procesos celulares que llevan a la morfogénesis. Los estudios histológicos, al describir los cambios en la organización del tejido, la aparición de diferentes formas de organización que conducen a la morfogénesis y los sitios y el tiempo en el cual ésto ocurre, forman la base a partir de la cual otro tipo de estudios, fisiológicos y moleculares, pueden desarrollarse, que cobran todavía más relevancia si se consideran las estrategias actuales de transformación genética.

En el caso particular del cultivo *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis*, el aspecto pendiente quizás de mayor relevancia en este momento es la falta de enraizamiento. Faltan mas estudios en los cuales se busque las condiciones que estimulen la formación de raíces (con sustancias promotoras del enraizamiento, manejando distintos tiempos de inducción etc.); así como estudios que reconozcan a nivel estructural, fisiológico o molecular las razones por las cuales se presenta o no el enraizamiento.

Por otro lado, continuar con estudios que permitan la utilización de otras estrategias para la regeneración de esta especie, como la embriogénesis somática, podría resultar de gran valor.

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Nil, MM. 1987. Tissue culture of Douglas -fir and Western North American conifers. *En: Bonga JM y DJ. Durzan (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Vol.3. Martinus Nijhoff Publishers.*
- Acosta-Pérez, R. 1992. Algunas coníferas del Estado de Tlaxcala. Folleto de divulgación No.14, Gob. del Estado de Tlaxcala, Jardín Botánico de Tizatlán.
- Ahuja, M R. 1993. Micropropagation *á la carte*. *En: Ahuja M.R. (ed) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 3-9.*
- Aitken-Christie, J y TA. Thorpe. 1984. Clonal propagation; gymnosperms. *En: Vasil I.K. (ed). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press. pp. 82-95.*
- Allen, G S. 1947a. Embryogeny and the development of the apical meristems of *Pseudotsuga*. II. Late embryogeny. *Amer. J. Bot. 34: 73-80.*
- Allen, G S. 1947b. Embryogeny and the development of the apical meristems of *Pseudotsuga*. III. Development of the apical meristems. *Am. J. Bot. 34:204-211.*
- Anónimo, 2001. NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial de la Federación. Miércoles 6 de marzo del 2002.
- Biondi, S y T A Thorpe. 1982. Growth regulator effects, metabolite changes, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. *Bot. Gaz. 143(1): 20-25.*
- Birch, RG. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 297-326.*
- Bonga, J M y P von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda.
- Bornman CH y TC Vogelmann. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant. 61: 505-512.*
- Buddendorf-Joosten JMC y EJ Woltering. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *En: Lumsden PJ, JR Nicholas y WJ Davies (eds.) Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Pub. Holanda. Pp. 165-190.*
- Burguess, J. 1985. An introduction to plant cell development. Cambridge University Press. Cambridge
- Cheah, KT y TY Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas-fir cotyledon. *Amer.J.Bot. 65(8): 845-849.*

- Cheng, TY. 1977. Recent Advances in development of *in vitro* techniques for Douglas-fir. *En: Sharp, W.R., P.O. Larsen, E.F. Paddock y V. Raghavan (Eds.). Plant cell and tissue culture, principles and applications. Ohio State University Press, Columbus. pp. 493-508.*
- Cheng, TY y TH Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. *Sci. 198: 306-307.*
- Debreczy, Z y I Rácz. 1995. New species and varieties of conifers from México. *Phytologia. 78(4): 217-243.*
- Domínguez-Álvarez, F A. 1994. Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México. Folleto Técnico No. 233. División Forestal. SAHR-INIFAP-CIRGC. México.
- Dumas E y O Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss. Org. Cult. 40: 231-235.*
- Durzan, D J y PK Gupta. 1987. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Sci. 52: 229-235.*
- Ellis, D D y D E Bilderback. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot. 76(3): 348-355.*
- El-Kassaby, Y y K Ritland. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-Fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. *Biodiversity and conservation. 5: 779-794.*
- Espinosa, J. 1979. Pinaceae. *En: Rzedowski y Rzedowski (eds.). Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. 1. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D.F.*
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: drawings and description of the genera *Abies, Cedrus, Pseudolarix, Keteleeria, Nothotsuga, Tsuga, Cathaya, Pseudotsuga, Larix* and *Picea*. Koletz Scientific Books, Köningstein. pp. 177-181.
- Farjon, A. 1998. World checklist and bibliography of conifers. Royal Botanical Gardens at Kew. Richmond, U.K.
- Flinn, BS, DT Webb y W Georgis. 1986. *In vitro* control of caulogenesis by growth regulator and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Can. J. Bot. 64: 1948-1956.*
- Flinn, BS, DT Webb y W Newcomb. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Can. J. Bot. 66: 1556-1565.*
- Flinn, BS, DT Webb y W Newcomb. 1989. Morphometric analysis of reserve substances and ultrastructural changes during caulogenic determination and loss of competence of eastern white pine (*Pinus strobus*) cotyledons *in vitro*. *Can. J. Bot. 67: 779-789.*

- Galindo-Flores, GL. 1996. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. vía organogénesis a partir de embriones maduros. III Congreso nacional de biotecnología. Chih., 14-18 de octubre. UACH-ANABAF. México.
- Gamborg, OL y GC Phillips. 1995. Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods. Springer-Verlag. Berlin.
- García-Campusano, F. 1999. Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis profesional, Depto. de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Ixtacuixtla, Tlaxcala.
- Gaspar T, C Kevers, C Penel, H Greppin, DM Reid y TA Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 32:272-289.
- George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology. 2da Ed. Exegetics Limited. Basingstoke, U.K.
- Gilissen, LJW, MJ van Staveren, JC Hakkert, MJM Smulders, HA Verhoeven y J Creemers-Molenaar. 1994. The competence of cells for cell division and regeneration in tobacco explants depends on cellular location, cell cycle phase and ploidy level. Plant Sci. 103: 81-91.
- Goldfarb, B y JB Zaerr. 1989. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco). In: Basay y Ds (eds.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlin. pp. 526-545.
- Gupta, PK y DJ Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 4: 177-179.
- Hanke, DE y SJ Green. 1994. The contribution of auxin and cytokinin to symmetry breaking in plant morphogenesis. En: Ingram DS y A Hudson (eds.). Shape and form in plants and fungi. The Linnean Society of London - Academic Press. pp. 209-219.
- Harry, IS y TA Thorpe. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of Jack pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 159-164.
- Hartman, K. 1987. Propagación de plantas. CECSA. México, D.F.
- Hermann, RK y DP Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: *Pinaceae*. En: Russell, MB y BH Honkala (eds.). Silvies of north america 1: Conifers. Agriculture Handbook 654. Vol.1. USDA Forest Services. Washington, D.C.
- Hicks, GS. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. Bot. Rev. 46(1):1-23.
- Howell, SH. 1997. Molecular genetics of plant development. Cambridge University Press. New York.

- Jansson, E y CH Borrmann. 1981. *In vitro* initiation of adventitious structures in relation to the abscission zone in needle explants of *Picea abies*: anatomical considerations. *Physiol. Plant.* 53: 191-197.
- Joy IV RW y TA Thorpe. 1999. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. *En: Soh, W y SS Bhojwani (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures.* Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 171-214.
- Kerstetter, RA y S Hake. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell.* 9: 1001-1010.
- Kirby, EG y ME Schalk. 1982. Surface structural analysis of cultured cotyledons of Douglas-fir. *Can.J.Bot.* 60: 2729-2733.
- Kolevska-Pleitikapic', B y Z Buturovic'-Deric'. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. *Plant Cell. Tiss and Org. Cult.* 41:189-192.
- Kulchetski, L, IS Harry, EC Yeung y TA Thorpe. 1995. *In vitro* regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. *Tree Physiology.* 15: 727-738.
- Lavender, DP. 1958. Viability of Douglas -fir seed after storage in the cones. *Research Note No.31.* Oregon Forest Lands Research Center. Corvallis, Oregon.
- Li, P y WT Adams. 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 19: 149-161.
- López-Curto, M L, JM Márquez-Guzmán y G Murguía Sánchez. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 1ª Ed. Facultad de Ciencias, UNAM.
- López-Escamilla, AL 2000. Organogénesis in vitro y adquisición de la competencia morfogenética a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*, Martínez (Gymnospermae) especie en peligro de extinción. Doctor en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- López-Escamilla, AL, LP Olguin-Santos, J Márquez, VM Chávez y R Bye. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, and endangered Mexican spruce tree. *Ann. Bot.* 86: 921-927.
- Lu, C, IS Harry, MR Thompson y TA Thorpe. 1991. Plantlet regeration from cultures embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens*Sarg). *Bot. Gaz.* 152(1): 42-50.
- Lyndon, RF. 1990. Plant development, the cellular basis. Unwin Hyman LTD. Londres.
- Mápula, LR, R Bonilla y DA Rodríguez. 1996. Germinación y crecimiento inicial de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en Chapingo, México. *Revista Chapingo: Ciencias Forestales.* 5: 111-117.
- Martínez, M. 1953. Las pináceas mexicanas. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F.

- Martínez-Pulido C, IS Harry y TA Thorpe. 1994. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:225-230.
- Meins, F. 1986. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. *En: Yoeman, M.M. (ed.). Plant cell culture technology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 7-25.
- Monjarás-González, G. 2001. Influencia de reguladores de crecimiento, substratos y medios de cultivo en la inducción de plántulas completas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis de Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala.
- Montes -Rivera, G. 1993. Guía metodológica para cultivar *in vitro* *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii*. Instituto Tecnológico Forestal No. 1. SEP. Durango.
- Nour, KA, EC Yeung y TA Thorpe. Shoot bud histogenesis from mature embryos and shoots of eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.) cultured *in vitro*. *Int. J. Plant Sci.* 154 (3): 378-385.
- Patel, K R y GP Berlyn. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Can. J. Bot.* 61: 575-585.
- Patel, KR y TA Thorpe. 1984. Histochemical examination of shoot initiation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Bot. Gaz.* 145(3): 312-322.
- Pelletier, G y S Laliberté. 2000. Effect of embryo orientation on the developmental sequence of adventitious organogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb). *Can. J. Bot.* 78: 1348-1360.
- Pérez-Sánchez, MA. 1996. Producción y viabilidad de las semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en las localidades de Tlaxco y Terrenate, Tlaxcala. Tesis profesional de licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala.
- Piqueras, A y PC Debergh. 1999. Morphogenesis in micropropagation. *En: Soh, W. Y S.S. Bhojwani (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures.* Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 171-214.
- Rumary, C, KR Patel y TA Thorpe. 1985. Plantlet formation in black and white spruce. II histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. *Can. J. Bot.* 64: 997-1002.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy.* Oxford University Press. New York.
- Saborio, F, WS Dvorak, JK Donahue y TA Thorpe. 1997. *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiol.* 17: 787-796.
- Sen, S, ME Magallanes-Ceduno y RH Kamps. 1994. *In vitro* micropropagation of Afghan pine. *Can. J. For. Res.* 24: 1248-1252.

- Steeves, TA y IM Sussex. 1989. *Patterns in plant development*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- Sul, IW y SS Korban. 1994. Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation on several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 30P: 131-135.
- Thorpe, TA y T Murashige. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.* 48: 277-285.
- Thorpe, TA 1982. Physiological and biochemical aspects of organogenesis *in vitro*. Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture.
- Thorpe, TA y K Patel. 1984. Clonal propagation: adventitious buds. *En: Vasil, K. (ed). Cell culture and somatic cell genetics in plants. Vol. 1. Academic Press Inc. USA.*
- Thorpe, TA e IS Harry. 1991. Clonal propagation of conifers. *Plant tissue culture manual. C3: 1-16. Kluwer Academic Publishers. Holanda.*
- Thorpe, TA, IS Harry y PP Kumar. 1991. Application of micropropagation to forestry. *En: Debergh, PC y RH Zimmerman (eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. pp. 311-336.*
- Thorpe, TA y PP Kumar. 1993. Cellular control of morphogenesis. *En: Ahuja, M.R. (ed.). Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 11-29.*
- Thorpe, TA y C Stasolla. 2001. Somatic embryogenesis. *En: Bhojwari, s.s. y W.Y. Soh (eds.). Current trends in the embryology of angiosperms. Kluwer Academic Pub. Dordrecht. pp279-336.*
- Villalobos, VM, TA Thorpe y EC Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo.* 51(9):43-59.
- Villalobos, VM, DWM Leung y TA Thorpe. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61: 497-504.
- Villalobos, VM, EC Yeung y TA Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63: 2172-2176.
- Vogelmann, TC, CH Bornman y P Nissen. 1984. Uptake of benzyladenine in explants of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 61: 513-517.
- Von Arnold, S. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. *IAPTC Newsletter. No. 56: 2-13.*
- Von Arnold, S y R Grönroos. 1986. Anatomical changes and peroxidase activity after cytokinin treatments inducing adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Bot. Gaz.* 147(4): 425-431.
- Von Arnold, S y C Hawes. 1989. Differentiation of bud mersitens and cataphylls during adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Can. J. Bot.* 67: 422-428.

- Wagley, LM, HJ Gladfelter y GC Phillips. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *In vitro*. II. Macro- and micro- photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep.* 6: 167-171.
- Westhoff, P, H Jeske, G Jürgens, K Klopstech y G Link. 1998. *Molecular plant development, from gene to plant.* Oxford University Press. New York
- Yeung, EC, J Aitken, S Biondi y TA Thorpe. 1981. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. *Bot. Gaz.* 142(4): 494-501.
- Zavala-Chávez, F y JT Méndez-Montiel. 1996. Factores que afectan la producción de semillas en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. en el Estado de Hidalgo, México. *Bot. Mex.* 36: 1-13.
- Ziv, M. 1999. Developmental and structural patterns of in vitro plants. *En: Soh, W. Y S.S. Bhojwani (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures.* Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 171-214.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ANEXOS

### MEDIO NUTRITIVO

SCHENK Y HILDEBRANDT (Gamborg y Phillips, 1995)

	<u>mg/l<sup>-1</sup></u>	<u>g/l</u>
▪ MACRONUTRIMENTOS		
KNO <sub>3</sub>	2500	2.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	400	0.4
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300	0.3
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200	0.2
▪ MICRONUTRIMENTOS		
KI	0.1	0.001
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.0	0.005
MnSO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	20	0.02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0	0.001
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.2	0.0002
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.2	0.0002
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2	0.0002
▪ FEDETA		
Na <sub>2</sub> EDTA	20	0.02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15	0.015
▪ VITAMINAS		
Piridoxina HCL	0.5	0.0005
Ácido nicotínico	5.0	0.005
Tiamina HCL	5.0	0.005
Mio-inositol	1000	1.0
▪ OTROS		
Polivinilpirrolidona	250	0.25
Agente Antivitrificante	1000	1.0
Sacarosa	30000	30.0
Phytigel®	5500	6.0
PH	5.7-5.8	

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN