

00361



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

CULTIVO *in vitro* DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS,
ESPECIE MEXICANA SUJETA A PROTECCIÓN
ESPECIAL.

T E S I S

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

GUADALUPE MONJARÁS GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

MEXICO, D. F.



AGOSTO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1980

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

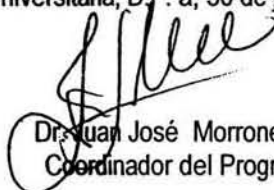
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

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 14 de junio del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Monjaras González Guadalupe**, con número de cuenta 501048817, con la tesis titulada: "**Cultivo in vitro de Pseudotsuga macrolepis Flous, especie mexicana sujeta a protección especial**", bajo la dirección del(a) **Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila**.

Presidente:	Dra. G. Judith Márquez Guzmán
Vocal:	Dr. Alejandro Martínez Palacios
Secretario:	Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Suplente:	Dr. Robert Bye Boettler
Suplente:	M. en C. Florencia T. A. García Campusano

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de junio del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Guadalupe Monjarás
González

02/08/04



El Comité Tutorial de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila.

Dra. Judith Márquez Guzmán.

Dr. Robert Bye Boettler.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, con el apoyo de la Biól. Gema L. Galindo Flores.

Así mismo, se contó con el apoyo del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Durante la realización de los estudios de maestría se recibió una beca otorgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y una beca complementaria por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGE) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Formó parte del proyecto CONAFOR-2002-C01-6416 "Conservación y mejoramiento genético de *Pseudotsuga* spp. conífera estratégica del estado de Tlaxcala y la región central del país" del cual es responsable en Dr. Vidal Guerra de la Cruz en coordinación con la Biól. Gema L. Galindo Flores. De este proyecto se recibió una beca durante la escritura de esta tesis.

Con un inmenso cariño y agradecimiento a

mis padres

Antonio Monjarás Rico e Inés González Martínez

a mis hermanas

Anell, Georgette y Yesica

a

Andrea

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Chávez del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología de la UNAM por estar siempre al pendiente, por sus correcciones, por su gran apoyo y por toda la ayuda en la realización del presente trabajo.

A la Biól. Gema L. Galindo Flores por todos los conocimientos compartidos en estos años, por su gran apoyo en todos los sentidos. Por su amistad, gracias.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán por las valiosas y minuciosas correcciones, comentarios y por todo su apoyo.

Al Dr. Robert Bye Boettler, por el apoyo y sugerencias.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios por su apoyo y por las valiosas correcciones a este trabajo.

A la M. en C. Florencia García Campusano por toda su ayuda, sus correcciones al presente trabajo, por el invaluable apoyo y principalmente por su amistad.

A Margarito Cruz Castillo por su gran ayuda para la recolección de material biológico porque sin su valor no hubiera sido posible contar con el material suficiente, principalmente por su amistad e incondicional apoyo.

A las personas de Laboratorio de Desarrollo en Plantas por su apoyo y gran ayuda en todo el proceso histológico realizado para este trabajo, especialmente a Florencia y a Karina.

A todas las personas que integran los laboratorios de Micorrizas y Sistemática del C.I.C.B. de la UAT por su apoyo y amistad.

Al fondo sectorial CONACYT-CONAFOR por el apoyo en el proyecto "Conservación y mejoramiento genético de *Pseudotsuga* spp. conífera estratégica del estado de Tlaxcala y la región central del país", principalmente al Dr. Vidal Cruz de la Guerra.

CONTENIDO

RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiii
1- ÁREAS BOSCOSAS Y CONÍFERAS.....	1
1.1 <i>Pseudotsuga</i>	2
1.2 <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous.....	8
2- CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV).....	12
2.1- Organogénesis.....	14
3- EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	17
3.1 Embriogénesis cigótica y somática.....	19
3.2- Etapas de embriogénesis somática.....	22
4- CTV DEL GÉNERO <i>Pseudotsuga</i>	26
5- JUSTIFICACIÓN.....	29
6- OBJETIVOS.....	30
6.1- General.....	30
6.2- Específicos.....	30
7- HIPÓTESIS.....	30
8- MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
8.1- Recolección de material biológico.....	31
8.2- Desinfección de la semilla y cultivo de embriones.....	31
8.3- Medios de cultivo.....	32
8.3.1- Inducción.....	32
8.3.2- Mantenimiento de callos.....	33
8.4- Análisis histológicos.....	34
9- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
9.1- Resultados de la recolección de material biológico.....	35
9.1.1- Recolección.....	35
9.1.2- Localidades.....	42
9.1.3- Años de recolección.....	44
9.2- Discusión de la recolección de material biológico.....	52
9.3- Resultados cultivo de embriones cigóticos.....	57
9.3.1- Análisis histológico.....	64
9.3.2- Otras respuestas del cultivo <i>in vitro</i>	68
9.4- Discusión cultivo de embriones cigóticos.....	72
9.4.1- Organogénesis.....	78
9.4.2- Formación de callo blanquecino.....	81
10- CONCLUSIONES.....	88

10.1- Recolección de material biológico.....	88
10.2- Cultivo de embriones cigóticos.....	88
10.3. Conclusión general.....	89
11- PERSPECTIVAS.....	90
12- APÉNDICES.....	91
13- BIBLIOGRAFÍA.....	100

Índice de tablas.

1- Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos vegetales.....	13
2- Inducción de embriogénesis somática en coníferas.....	18
3- Estudios <i>in vitro</i> de inducción de brotes adventicios del género <i>Pseudotsuga</i>	26
4- Estudios sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> del género <i>Pseudotsuga</i>	27
5- Concentraciones (mg/l) de la combinación 2,4-D/K probadas para el cultivo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	32
5a- Combinaciones y concentraciones (mg/l) de reguladores de crecimiento para la inducción de embriones somáticos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	57
6- Diferentes condiciones de cultivo para disminuir la oxidación de callos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	33
7- Fechas de recolección de conos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> realizadas en diferentes localidades del estado de Tlaxcala, Méx., en 2001, 2002 y 2003.....	35
8- Total de conos recolectados, semillas desarrolladas y vanas por cono de <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	38
9- Valores totales de recolectas de la localidad San Juan Terrenate (2) respecto al porcentaje total de todas las recolectas.....	44
10- Recolectas de conos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> durante 2001.....	45
11- Recolectas de conos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> durante 2002.....	48
12- Recolectas de conos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> durante 2003.....	50
13- Ciclo fenológico de <i>Pseudotsuga</i> , comparación entre Norte América y Tlaxcala, Méx.....	52
14- Combinaciones y concentraciones (mg/l) de reguladores de crecimiento para la inducción de callo blanquecino a partir de embriones cigóticos de <i>P. macrolepis</i> cultivados <i>in vitro</i>	61
15- Observaciones histológicas realizadas a callos de <i>P. macrolepis</i>	64

Índice de figuras.

1- Superficie forestal por tipo de vegetación, 1994.....	1
2- Distribución natural del abeto Douglas.....	4
3- Ciclo fenológico de <i>Pseudotsuga</i>	6
4- Vista general de un embrión de conífera maduro.....	7
5- Descripción general <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	9
6- Distribución de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> en el Estado de Tlaxcala.....	10
7- Proceso general de la producción de brotes adventicios.....	15
8- Embriogénesis cigótica de <i>Pinus</i> y <i>Picea</i>	20
9- Etapas de embriogénesis somática.....	22
10- Técnicas histológicas utilizadas para fijar callos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> obtenidos a partir del cultivo de embriones cigóticos.....	34
11- Recolección de material biológico y estados de maduración de conos de <i>P. macrolepis</i>	36
12- Relación entre las fases del ciclo reproductivo de <i>P. macrolepis</i> con los periodos de recolectas realizadas entre 2001 y 2003.....	37
13- Estado de desarrollo de megagametofitos y embriones de <i>P. macrolepis</i>	41
14- Ubicación de áreas de recolección de conos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> en el estado de Tlaxcala.....	43
15- Daños en conos de <i>P. macrolepis</i> causados por aves, insectos y otros factores.....	47
16- Respuesta de embriones <i>P. macrolepis</i> a los RCV en diferentes etapas de desarrollo.....	59
17- Respuesta de embriones de <i>P. macrolepis</i> a los tratamientos con RCV y recipientes de cultivo utilizados	62
18- Análisis histológico de callos de <i>P. macrolepis</i>	65
19- Observaciones histológicas obtenidas a partir de cortes de callos de <i>P. macrolepis</i> en diferentes estados de desarrollo cultivados en distintos tratamientos con RCV.....	67

ABREVIATURAS.

- 2,4-D - Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.
2iP - 2 Isopentiladenina.
ABA - Ácido abscísico.
AIA - Ácido indolacético.
AIB - Ácido indolbutírico.
ANA - Ácido naftalén acético.
BA - Bencil aminopurina.
CICB - Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas.
CTV - Cultivo de Tejidos Vegetales.
ES - Embriones Somáticos.
FAA - Formol-Alcohol-Ácido acético.
K - Kinetina.
MS - Murasige y Skoog (medio nutritivo).
RCV - Reguladores de Crecimiento Vegetal.
SH - Schenk y Hildebrandt (medio nutritivo).
UAT - Universidad Autónoma de Tlaxcala.

RESUMEN.

La problemática que enfrenta el género *Pseudotsuga* en México, ha llevado a las 4 especies que se encuentran en el país a ser consideradas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 como especies sujetas a protección especial (DOF, 2001). En el caso de *Pseudotsuga macrolepis*, se han realizado diversos trabajos con el propósito de dar alternativas para su regeneración; entre ellas se han utilizado técnicas de cultivo de tejidos para la obtención de brotes adventicios vía organogénesis directa; no obstante, no se ha logrado establecer un protocolo para el enraizamiento de los brotes. Por lo anterior, la embriogénesis somática, representa una alternativa de gran importancia ya que se obtienen embriones bipolares.

Se realizaron recolectas en campo a lo largo de 3 años con el propósito de obtener embriones y megagametofitos en diferentes etapas de desarrollo, para explorar su potencial morfogénico durante el cultivo *in vitro*. En las localidades estudiadas en el estado de Tlaxcala, se observó un retraso de 2 meses en el ciclo fenológico de *Pseudotsuga*, en comparación a lo reportado para *P. menziesii*; así mismo, se encontró que un 44.96% de las semillas recolectadas estuvo vanas y 1% plagadas por *Megastigmus* sp. La localidad de San Juan Terrenate (2) mostró altos índices de reproducción ya que se encontró un bajo porcentaje de semillas vanas con respecto al de semillas con embrión y se logró encontrar tanto megagametofitos como embriones en diferentes etapas de desarrollo.

Los embriones y megagametofitos recolectados se sometieron a uno de 20 tratamientos con distintas concentraciones de auxinas (0-3 mg/l) y citocininas (0-2 mg/l) y medios de cultivo (SH y MS); durante todo el proceso los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 22°C. En los tratamientos con concentraciones entre 0 y 1 mg/l de auxinas, se obtuvo la formación de brotes. En los tratamientos con 2 y 3 (mg/l) de auxinas, independientemente de la concentración de la citocininas se obtuvo la formación de callo blanquecino y friable; sin embargo, no se logró obtener embriones somáticos. Tanto embriones en etapa precotiledonaria como cotiledonaria respondieron a los tratamientos expuestos no así los megagametofitos. Por otro lado, se observó la formación de grupos de células meristemáticas en tratamientos con 2 y 3 mg/l de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; sin embargo, al igual que en otros trabajos el proceso de embriogénesis somática si es que se inició, se detuvo. La oxidación representó una limitante muy importante en el cultivo *in vitro* de callos de *P. macrolepis*; a pesar de los intentos no se logró establecer un medio adecuado para controlarla y evitarla.

SUMMARY.

Pseudotsuga macrolepis Flous is a conifer that has been recently declared a protected species in Mexico (NOM-059-ECOL-2001), as a result of its low population numbers, low natural regenerative capacity and the overall lack of knowledge concerning its current ecological situation. Attempts to regenerate this species using tissue culture techniques have met with limited success; notwithstanding that a protocol to produce adventitious shoots by direct organogenesis has been established, rooting has remained sporadic and difficult to obtain. Somatic embryogenesis could represent an important alternative, since bi-polar embryos are formed, which allows the rooting stage to be bypassed. The overall purpose of this study was to explore the potential of *P. macrolepis* zygotic embryos and megagametophytes to form somatic embryos *in vitro*.

In order to obtain embryos and megagametophytes in different developmental stages to use as explants for *in vitro* culture, field recollections of the seeds were carried out during three consecutive years, in three different locations in the State of Tlaxcala. *P. macrolepis* showed a two-month delay in its phenological cycle when compared to reports for *P. menziesii*; likewise, 44.96% of the seeds were empty and 1% were attacked by *Megastigmus* sp. The locality in San Juan Terrenate (2) had the highest reproductive index, showing a low percentage of empty seeds when compared with seeds containing embryos; both embryos and megagametophytes in different developmental stages were found.

The recollected embryos and megagametophytes were cultured in the dark, in one of twenty treatments which differed in their auxin (0-3 mg/l) and cytokinin (0-2 mg/l) concentration, alone or combined, as well as in the composition of the growth media (SH and MS). In the treatments with auxin concentrations ranging from 0 and 1 mg/l, adventitious buds were formed. In the treatments in which 2 and 3 mg/l of auxin was used, independently of the concentration of cytokinin, the formation of a white friable callus was obtained; however, no somatic embryos were observed. Embryos of both precotyledonary and cotyledonary stages responded to the treatments, unlike megagametophytes which did not respond at all. Interestingly, the formation of groups of meristematic cells was observed in the treatments in which 2 and 3 mg/l of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid was used; although it is possible that if initiated, the embryogenic process was detained soon after. Oxidation was a very important limitation for the *in vitro* culture of the *P. macrolepis* calli; notwithstanding all the effort, an adequate medium to control or avoid this situation could not be established.

INTRODUCCIÓN.

De las 250,000 especies vegetales registradas que existen a nivel mundial, 25,000 se encuentran en México (www.inegi.gob.mx). Sin embargo, 979 de estas están en la lista de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (DOF, 2001), debido a problemas de sobrevivencia que enfrentan en su propio hábitat. Entre estas especies están las del género *Pseudotsuga* (*P. macrolepis*, *P. flahualti*, *P. guinieri* y *P. redheri*).

Los individuos del género *Pseudotsuga* pertenecen a la familia Pinaceae y son árboles con: importancia ecológica, potencial maderable y ornamental (como árbol de navidad); en México se encuentra restringido a pequeñas poblaciones de escasos individuos desde Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, hasta Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Espinosa, 1979). En este último estado se localiza en 4 municipios del noreste que son Tlaxco, Emiliano Zapata, Terrenate y Altzayanca. No obstante, corre el peligro de ser erradicada totalmente de Tlaxcala debido a factores tales como: una baja tasa de regeneración natural, incendios forestales, tala inmoderada, apertura de nuevas zonas de cultivo, ataque de aves, roedores e insectos (Méndez-Montiel y Zavala-Chávez 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

Lamentablemente, las especies de *Pseudotsuga* en México, principalmente las del centro del país, han sido poco estudiadas y a menudo hasta relegadas (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Pocos han sido los trabajos de investigación realizados en México para *Pseudotsuga* y la mayoría son de carácter ecológico (Yañez, 1991; Méndez-Montiel y Zavala-Chávez, 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; Guerra-De la Cruz, 2001; Reyes *et al.*, 2003; Mápula-Larreta *et al.*, 2004). Para *Pseudotsuga macrolepis*, se han realizado trabajos de investigación aplicando técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) con el propósito de establecer un protocolo para su regeneración *in vitro* (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001).

El CTV ha demostrado ser una alternativa importante para la recuperación de especies amenazadas o de interés forestal, ya que tiene el potencial de incrementar significativamente la productividad a través de la propagación de genotipos seleccionados por su velocidad de crecimiento, la calidad de su madera o resistencia a enfermedades; características que pueden ser heredadas al bosque entre 8 y 25 años antes que a través del uso de técnicas convencionales como el uso de semilleros (Mohammed y Vidaver, 1988). Sin embargo, las dificultades que representa el establecimiento de un protocolo de regeneración para muchas especies forestales, así como los altos costos que implica, han limitado el aprovechamiento y la implementación de estas técnicas a gran escala.

En el caso de *Pseudotsuga macrolepis*, se ha logrado establecer un protocolo que permite la obtención de brotes adventicios vía organogénesis directa, a partir del cultivo de embriones maduros (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001); sin embargo, al igual que para muchas especies de coníferas, no se ha logrado obtener el enraizamiento. Por este motivo, resulta indispensable continuar con investigaciones que culminen con el establecimiento de plántulas completas, ya sea a través de la generación de nuevos protocolos para el enraizamiento así como a través de la obtención de embriones somáticos.

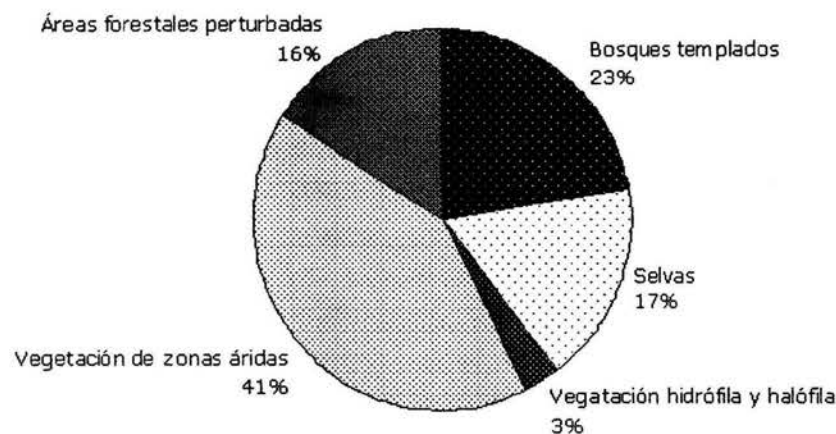
La embriogénesis somática ofrece una alternativa muy importante para la regeneración *in vitro*, ya que implica la obtención de embriones bipolares a partir de células somáticas, por un proceso similar al de la embriogénesis cigótica (Thorpe y Harry, 1991); es decir, se forma una estructura que contiene tanto un meristemo apical de brote como un meristemo radicular, (Thorpe *et al.*, 1991; Thorpe y Harry, 1991), por lo que ya que no se requiere pasar por una etapa de enraizamiento, reduciendo notablemente las dificultades y el tiempo requeridos para la obtención plántulas. A pesar de esta notable ventaja, la embriogénesis somática no ha podido ser utilizada de manera generalizada en las coníferas, ya que muchas especies se han mostrado recalcitrantes a esta vía de regeneración; situación que se dificulta por el desconocimiento que aún existe de los eventos celulares, bioquímicos y moleculares que conducen el desarrollo embrionario y que repercuten en la capacidad de manipular los tejidos y condiciones del cultivo para obtener una embriogénesis somática exitosa (Tautorius *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Brown *et al.*, 1995; von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003).

Tomando en consideración que no ha sido posible establecer un protocolo de micropropagación para *Pseudotsuga macrolepis* vía organogénesis y que la embriogénesis somática representa una importante alternativa para su regeneración, en este trabajo se decidió explorar el potencial morfogénico de embriones inmaduros y maduros de *Pseudotsuga macrolepis* cultivados *in vitro*, contemplando un amplio barrido de la combinación de 2,4-D y K; para buscar las condiciones propicias para obtener embriogénesis somática.

1- ÁREAS BOSCOSAS Y CONÍFERAS.

La extensión territorial de México es de 1 964 375 km² de los cuales 1 959 248 km² son superficie continental y 5 127 km² superficie insular (www.inegi.gob.mx). Aproximadamente el 72% (141 745 169 hectáreas) de la superficie continental se encuentra ocupada por algún tipo de vegetación y se le ha denominado superficie forestal (www.semarnat.gob.mx); esta comprende bosque, selva, vegetación de zonas áridas, vegetación hidrófila y halófila y áreas perturbadas encontrándose en diferentes proporciones (Fig. 1).

Figura 1. Superficie forestal por tipo de vegetación, 1994.



Nota: Los porcentajes se refieren a la superficie total forestal: 141 745 169 hectáreas.

Fuente: SARH, **Inventario nacional forestal periódico, 1992-1994**, Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre, SARH, México, 1994 (www.semarnat.gob.mx).

No obstante, debido a diversos factores, un sin número de estas especies se encuentran en riesgo y entre ellas algunas coníferas de gran importancia tanto económica como ecológica (www.lectura.ilce.edu.mx; Chávez y Rubluo, 1995; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

En la República Mexicana las coníferas se encuentran en los bosques templados y fríos y se encuentran representadas por cinco familias botánicas que son: Cupressaceae, Pinaceae, Podocarpaceae, Taxaceae y Taxodiaceae (Acosta-Pérez, 1992). Las pináceas, son árboles o raramente arbustos, siempre verdes, excurrentes, es decir, con un eje central bien definido y ramas pequeñas laterales; hojas simples o agrupadas, aciculares o lineares; fruto de forma globosa o cónica, compuesto de escamas que protegen a las semillas (Acosta-Pérez, 1992).

De los bosques se producen una multitud de bienes y servicios entre los cuales se pueden mencionar la obtención de materiales de construcción; diversos productos forrajeros, comestibles, artesanales e industriales; así como tierra de monte, leña combustible; resinas y gomas, además de tener algunos usos médicos. Como comunidad, las coníferas contribuyen a la regulación del ciclo hidrológico, a mantener un microclima adecuado, a purificar la atmósfera y el agua; son un refugio de la fauna y un paraje para la recreación humana (Acosta-Pérez, 1992).

Los bosques ofrecen un gran número de beneficios; sin embargo, es sabido que son deforestados más rápido de lo que están siendo regenerados; esto, aunado a efectos causados por factores tales como: enfermedades, plagas e incendios forestales, ponen en peligro la existencia de especies de gran importancia forestal (Thorpe *et al.*, 1991). En la república mexicana, existen 38 especies de coníferas que se encuentran de la lista de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (apéndice 1), de las cuales 6 especies están consideradas en peligro de extinción, 2 amenazadas y 30 sujetas a protección especial; de estas, 14 son consideradas endémicas y 24 no endémicas (DOF, 2001).

Debido al gran número de especies bajo riesgo, es necesario establecer estrategias de conservación, manejo y aprovechamiento de estas. En nuestro país poco se ha hecho para dar soluciones a esta gran problemática, entre los estudios planteados para responder a este problema se han realizado trabajos de micorrización y germinación en vivero utilizando diferentes sustratos, niveles de sombreado y fertilizantes (Galindo-Flores, comunicación personal; Cruz-Castillo, comunicación personal); por otra parte, se han planteado trabajos utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales para especies amenazadas como *Picea chihuahuana* (López-Escamilla, 2000; Sánchez-Espinosa, 2001) y *Pseudotsuga macrolepis* (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001), no obstante, aun no se han logrado establecer técnicas completas para su regeneración *in vitro*.

1.1- *Pseudotsuga*

El género *Pseudotsuga* fue creado por Carrière en 1867 con base en *Pinus douglasii* Sabine ex D. Don Lamb con *Pseudotsuga menziesii* como especie tipo. Más tarde, en 1950 Franco fue el primero en demostrar que *Pinus douglasii* D. Don es un sinónimo de *Abies menziesii* Mirb. siendo este el primer nombre válido publicado para el abeto Douglas (Farjon, 1990).

En total 22 especies y 2 variedades de este género han sido descritas y casi la mitad (10 especies y 2 variedades) fueron publicadas por Flous entre 1934 y 1936. Sin embargo, según algunos autores la clasificación taxonómica que Flous realizó esta hecha basándose en diferencias mínimas y poco constantes, por lo que no es aceptada excepto por Gaussen (1966 *fide* Farjon, 1990) y Martínez (1953) en cuanto a las especies mexicanas se refiere. Martínez (1953) menciona "después de haber hecho la observación de numerosos ejemplares es mi opinión que las especies establecidas por Flous merecen tenerse en cuenta, sí bien tal vez sea posible reducir su número de especies". De esta forma, se consideran *Pseudotsuga flahualti*, *P. guinieri*, *P. redheri*, *P. macrolepis* y *P. menziesii* var. *oaxacana* como las especies del género *Pseudotsuga* que se encuentran en México (Martínez, 1953; Debreczy y Rácz, 1995).

Por su parte El-Kassaby *et al.* (1983 *fide* Goldfarb y Zaerr, 1989) y la mayoría de los botánicos de Norte América reconocen ocho especies en todo el género *Pseudotsuga*. Seis de éstas se encuentran distribuidas de forma natural en el este de Asia: *Pseudotsuga japonica* (Shiras) Beissn se encuentra en Japón; *P. wilsoniana* Hayata en Taiwán; *P. forrestii* Craib., *P. sinensis* Dode., *P. gaussenii* Flous y *P. brevifolia* Chang et L. K. Fu. se localizan en China. En Norteamérica se encuentran dos especies: *P. macrocarpa* (Torr.) Mayr, con una distribución limitada al sur de California y *P. menziesii* (Mirb.) Franco (abeto Douglas), que se encuentra a través del oeste de Norteamérica (Fowells, 1965 *fide* Goldfarb y Zaerr, 1989); siendo ésta una de las especies de mayor importancia maderable económicamente hablando en Estados Unidos y por ello una de las más estudiadas. *Pseudotsuga menziesii* tiene dos variedades: la costera *P. menziesii* var. *menziesii* y la que crece en áreas internas del país, denominada variedad interna o variedad *glauca* (Goldfarb y Zaerr, 1989). De acuerdo con esta clasificación se considera que las especies de este género que se encuentran en México pertenecen a la especie *P. menziesii* var. *glauca* (Acosta-Pérez, 1992; Debreczy y Rácz, 1995; Hermann y Lavender, 1999).

Con respecto a esto último, Li y Adams (1989) realizaron el estudio de la variación isoenzimática de poblaciones de *P. menziesii* utilizando semillas procedentes de 104 localidades (incluyendo dos localidades del norte de México que fueron: a.- General Cepeda en el estado de Coahuila y b.- La Encantada en el estado de Nuevo León) para determinar los patrones de variación genética y realizar inferencia filogenéticas. Como resultado se observó que las semillas provenientes de la localidad "b" se agrupó con las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*, pero la "a" resultó genéticamente distinta al resto de las demás especies.

Lamentablemente, las especies de *Pseudotsuga* en México (principalmente las del centro del país) han sido poco estudiadas y a menudo hasta relegadas (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996), a pesar de que es posible que el centro de origen del género sea el estado de Coahuila, Méx., ya que el registro fósil más antiguo (90 millones de años) corresponde a esa localidad (Domínguez, 1994).

Distribución general: En América el género se encuentra desde la Columbia Británica hasta el sistema montañoso del centro de México (Fig. 2); la distribución latitudinal del género es muy amplia, según Hermann y Lavender (1999) se extiende desde los 19° hasta los 55° N; sin embargo, Debreczy y Rácz (1995) reportaron que se encuentra en los 16° N (en el estado de Oaxaca, Méx.) representando la localización más sureña de *Pseudotsuga* en el mundo.

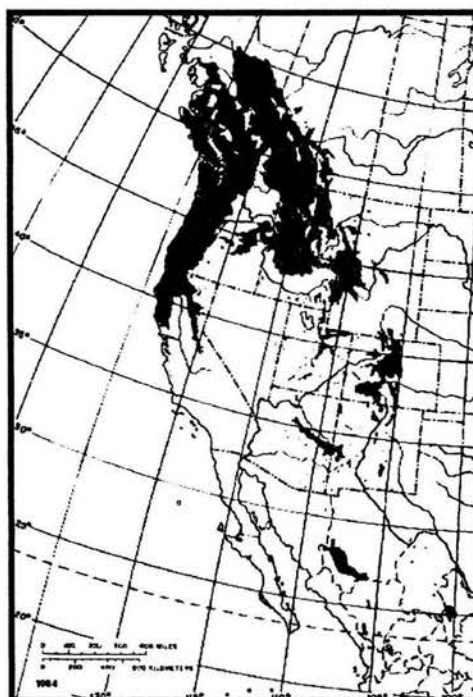


Figura 2. Distribución natural del abeto Douglas (Hermann y Lavender, 1999).

Generalmente se localiza en pendientes con exposición sur en el norte y pendientes con exposición norte en el sur (Hermann y Lavender, 1999) y es posible encontrarla desde el nivel del mar hasta los 3751 m (este último en el estado de Oaxaca, México) (Farjon, 1990; Domínguez, 1994; Debreczy y Rácz, 1995; Hermann y Lavender, 1999). De acuerdo a la latitud y altitud, *Pseudotsuga* se encuentra a temperaturas desde los -9 hasta los 30 °C con precipitaciones entre los 360 y 350 mm y de 0 a 580 mm de nieve (Hermann y Lavender, 1999); en suelos ligeramente ácidos, podzólicos, bien drenados

(Farjon, 1990); asociada con diferentes especies vegetales dependiendo de su localización.

Usos: En general la madera de *Pseudotsuga* es de buena calidad por sus nudos delgados, fuste recto y cilíndrico así como por la disposición de ramas y su extrema dureza; razón por la cual es usada para construcciones, pilotes para minas, pilotes para transmisión telefónica, astilla para tableros aglomerados, contenedores para empaques industriales y embarcaciones, vigas, madera para celulosa, pailas para montacargas y como árbol de navidad; en México suele importarse con este propósito (Goldfarb y Zaerr, 1989; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

Ciclo de vida: Según Hermann y Lavender (1999) los árboles de este género comienzan a producir estróbilos entre los 12 y los 15 años de edad, por otra parte, Silen (1978 *fide* Pérez-Sánchez, 1996) y Niembro (1979) reportan que *Pseudotsuga* produce conos entre los 20 y los 40 años y rara vez antes de los 12.

Los conos masculinos son usualmente pequeños de 1 a 2 cm de largo y están constituidos por microsporofilos que se encuentran arreglados en forma de espiral y son más o menos membranosos; cada uno de ellos contiene dos microsporangios. Un microsporangio joven contiene muchos microsporocitos (microsporas madre). En primavera los microsporocitos sufren un proceso de meiosis y cada uno da cuatro microsporas haploides, cada microspora se desarrolla hasta formar un grano de polen, que es transportado por el viento hasta los conos femeninos; el grano de polen está conformado por dos células protaliales, una célula generativa y una célula que dará origen al tubo polínico (Raven *et al.*, 2000).

Los conos femeninos son más complejos que los conos de polen; están constituidos por escamas subtendidas por una bráctea estéril, cada escama alberga dos óvulos. Las escamas (25-30 por cono) están arregladas en forma espiral a lo largo del eje del cono. Cada óvulo contiene una nucela multicelular (megasporangio), rodeado por el integumento (a partir del cual se desarrolla la testa), que tiene una pequeña apertura llamada micrópilo ubicada enfrente del eje del cono. Cada megasporangio contiene un megasporocito (megaspore madre) que sufre un proceso de meiosis y da lugar a una serie de cuatro células denominadas megasporas. De estas cuatro megasporas sólo una llega a ser funcional y las tres restantes degeneran (Raven *et al.*, 2000).

El ciclo reproductivo de *Pseudotsuga* toma alrededor de 18 meses desde que se forman los primordios de conos en abril (Allen y Owens, 1972; Hermann y Lavender, 1999;

Williams, 2000) hasta la dispersión de las semillas en septiembre del año siguiente (Fig. 3). El ciclo inicia con la formación de primordios o yemas laterales durante el mes de abril y de acuerdo con Allen y Owens (1972) éstos pueden tomar 5 cursos que son:

1. Abortar prematuramente y desaparecer.
2. Desarrollar parcialmente y permanecer como yemas latentes.
3. Desarrollar como yemas vegetativas.
4. Desarrollar como yemas reproductivas de conos de semilla, localizándose en la parte apical del brote emergente.
5. Desarrollar como yemas reproductivas de conos polínicos, localizándose cerca de la base del brote emergente.

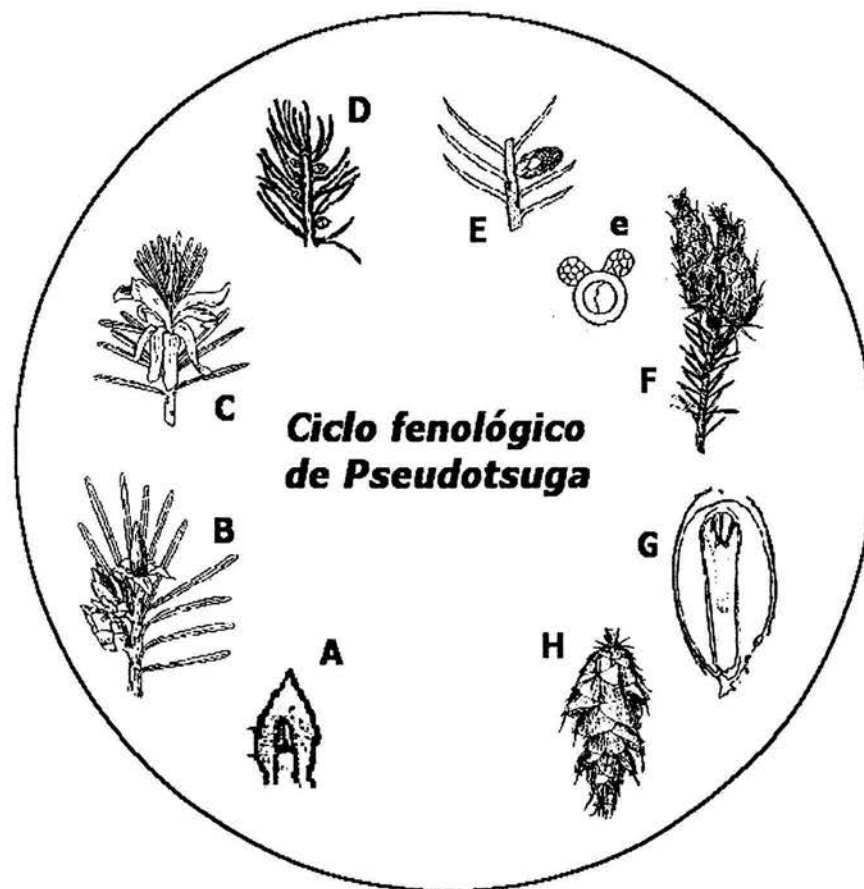


Figura 3. Ciclo fenológico de *Pseudotsuga* (Allen y Owens, 1972 modificado). A y B) Formación y crecimiento de la yema lateral; rompimiento de la yema vegetativa (abril -mayo); C) Elongación del renuevo y alargamiento del primordio de la yema lateral (abril-julio); D) Determinación del primordio; formación de hojas, brácteas y microsporofilo (julio – noviembre); E y e) Meiosis y desarrollo del polen (febrero – marzo); Entre E y F) Rompimiento de las yemas de los conos, polinización, germinación del polen y fertilización (abril – junio); F) Alargamiento de conos (mayo - junio); G) Desarrollo de embriones y semillas (junio – septiembre); H) Conos maduros y abiertos, desprendimiento de semilla (septiembre).

Las yemas se encuentran completamente formadas para octubre y noviembre y entran en latencia a inicios de diciembre. La meiosis y desarrollo del polen inicia entre marzo y abril; así mismo, los primordios de conos se abren y la polinización de los conos comienza. Después de la polinización la escama crece junto con los óvulos para protegerlos. En *P. menziesii* var. *menziesii* la polinización se realiza durante marzo y abril en áreas cálidas y a finales de mayo o principios de junio en áreas frías (Hermann y Lavender, 1999), siendo el clima un factor importante para la maduración y liberación de polen.

Una vez que se ha realizado la polinización, se diferencian los arquegonios, usualmente dos o tres, cerca del micrópilo en el megagametofito, y algún tiempo después se realiza la fertilización (Raven *et al.*, 2000). Comúnmente todos los arquegonios son fertilizados y comienzan a desarrollarse; fenómeno comúnmente llamado poliembrionía (Raven *et al.*, 2000; Raghavan y Sharma, 1995), no obstante, sólo uno de ellos se desarrolla totalmente dando origen a un embrión, conformado por cotiledones, meristemo apical, hipocótilo, radícula y una capa protectora de la radícula (Fig. 4).

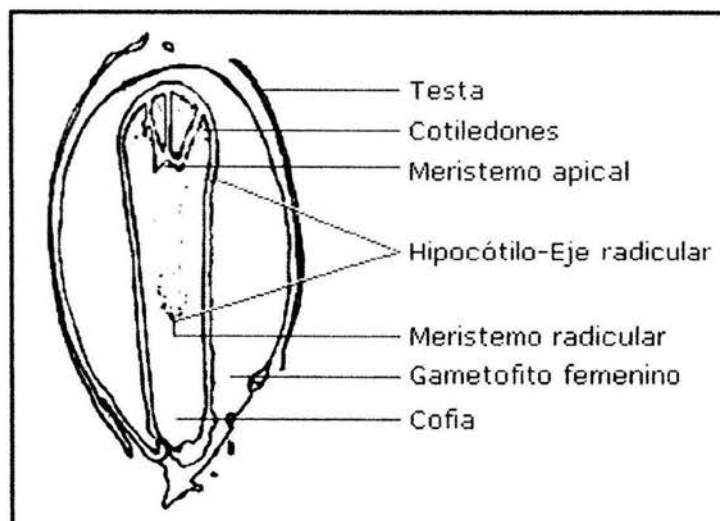


Figura 4. Vista general de un embrión de conífera maduro (Raven, 2000 modificado).

El proceso de fertilización de *Pseudotsuga* se realiza en abril y los conos de semilla comienzan a crecer en una fase muy rápida; entre agosto y septiembre los embriones y semillas se desarrollan y a finales de septiembre comienzan a liberarse las semillas maduras (Allen y Owens, 1972). Con respecto a esto, Niembro (1979) menciona que en México los meses de maduración de la semilla de *Pseudotsuga* son octubre, noviembre y diciembre; mientras que Yáñez (1972 *fide* Pérez-Sánchez, 1996) menciona que para el municipio de Tlaxco, Tlax. corresponde a septiembre y octubre.

Así mismo, Hermann y Lavender (1999), reportan que la maduración de los conos depende de la elevación altitudinal en la que se encuentre la población; por ejemplo en las poblaciones de *P. menziesii* var. *menziesii* que se encuentran a elevaciones medias o bajas los conos maduran a mediados de agosto, siendo el caso de Oregon y a mediados de septiembre en el norte del estado de Washington y el sur de la Columbia Británica.

En los árboles la producción de semillas se presenta con cierta periodicidad cíclica que se manifiesta en una cosecha abundante un año, seguido de un periodo de baja producción que puede variar entre 2 y 7 años y se denomina año semillero. Años semilleros consecutivos son improbables debido al agotamiento de las reservas de carbohidratos durante la producción de las semillas y la necesidad de acumular reservas frescas en el año siguiente (Franco, 1990; Hermann y Lavender, 1999).

1.2 *Pseudotsuga macrolepis* Flous

En este trabajo, se consideró la clasificación taxonómica propuesta por Martínez (1953) que establece 4 especies de *Pseudotsuga* en México. Entre las especies reconocidas por Martínez (1953) se encuentra *P. macrolepis* Flous cuyos nombres comunes son: abeto, ayacahuite, hayarín colorado, pinabete y guayame (Martínez, 1953; Acosta-Pérez, 1992; DOF, 2001). Su clasificación según Acosta-Pérez (1992) es:

División:	Pinophyta (Gimnospermas)
Subdivisión:	Pinophytina
Clase:	Coniferopsida (Coníferas)
Orden:	Coniferales
Familia:	Pinaceae
Género:	<i>Pseudotsuga</i>
Especie:	<i>P. macrolepis</i>

Esta conífera, monoica, anual; se caracteriza por alcanzar una altura de 12 a 15 m y algunas veces hasta 35 m, el diámetro normal del fuste es de 35 a 50 cm, con ramas subverticiladas o irregularmente dispuestas, las inferiores extendidas y las superiores levantadas formando una capa irregular y un poco rala; la corteza es grisácea por fuera y anaranjada por dentro, áspera y hendida, dividida en pequeñas placas irregulares, las ramillas son delgadas, largas y frágiles, de color moreno oscuro y desprovistas de hojas en su parte inferior, con las cicatrices de las hojas más o menos salientes. Las hojas son lineales de 15 a 25 mm de largo por 1 a 1.5 mm de ancho, verdes, pálidas en la cara

inferior, ápice agudo y en ocasiones redondeado con la base algo retorcida. Los conos son largamente ovoides, de 5.5 a 8 cm de largo (en algunas ocasiones 10 cm) por 3.5 a 4 cm de diámetro; con 25 a 30 escamas (el color varía según el estado de desarrollo, siendo morado en la etapa muy inmadura, pasando por verde hasta adquirir una coloración café-rojizo oscuro en la etapa madura); brácteas de 25 a 30 mm de largo por 5 mm de ancho, con el borde rasgado hacia la parte superior y la punta central saliente. Los conos masculinos generalmente tienen una longitud de 1-2 cm y una coloración amarillo-rojiza. Semillas vagamente ovoides o subtriangulares, de 5 a 7 mm de largo por 3.6 mm de ancho; el ala es de 15 a 16 mm de largo incluyendo la semilla y tiene un color castaño claro; las hojas cotiledonares son seis (Fig. 5) (Martínez, 1953; Acosta-Pérez, 1992; Mápula *et al.*, 1996).

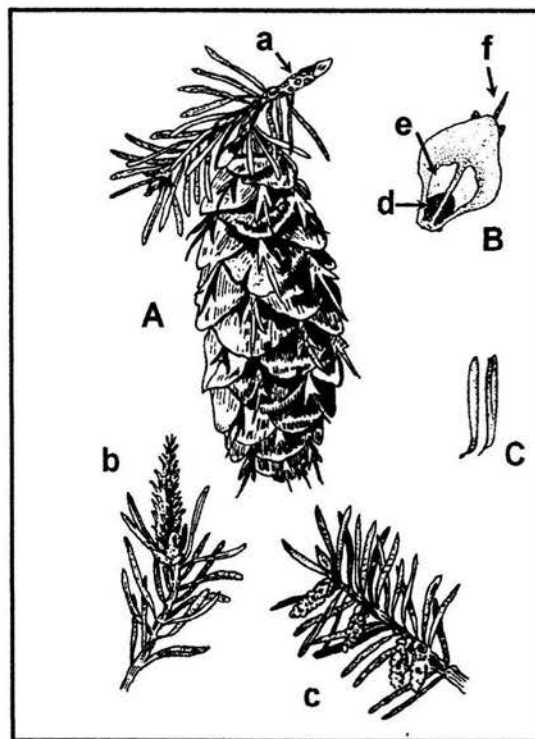


Figura 5. Descripción general *Pseudotsuga macrolepis*. A) Rama con cono femenino, a) cicatriz de la hoja, b) cono femenino, c) conos masculinos; B) Escama con semillas, d) semillas (dos por escama), e) ala de la semilla, f) bráctea de la escama; C) Hojas.

Fuente: www.mek.iif.hu/porta/szint/termesz/biologia/fenyok/html/nyitva/duglasz.htm (modificado)

Esta especie se encuentra restringida a pequeñas poblaciones desde Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, hasta Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Espinosa, 1979). En Tlaxcala, se localiza en 4 municipios del noreste, que son Tlaxco, Emiliano Zapata, Terrenate y Alzayanca (Fig. 6), no obstante, corre el peligro de ser erradicada totalmente del área estatal.

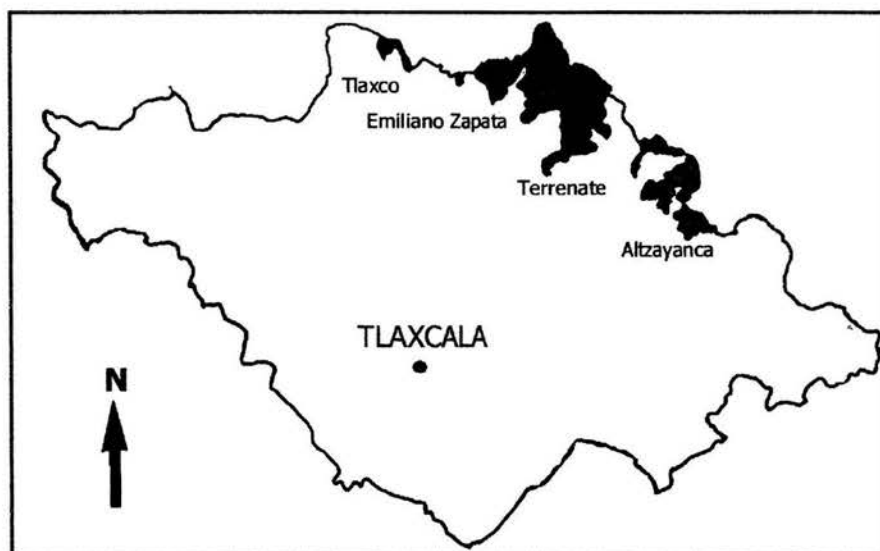


Figura 6. Distribución de *Pseudotsuga macrolepis* en el Estado de Tlaxcala.

En la franja donde se distribuye *P. macrolepis* en el estado de Tlaxcala el clima es templado-húmedo, con precipitaciones en verano y un porcentaje de lluvia invernal menor de 5 mm. Este clima se encuentra extendido en la entidad. El régimen pluvial medio anual tiene un rango entre 600 y 1 000 mm y la temperatura media anual fluctúa entre 12 y 16°C. Los meses de junio, julio y agosto registran la mayor precipitación, que va de 150 a 160 mm, en tanto que febrero presenta la mínima: 5 mm. La más alta temperatura media mensual corresponde a abril y mayo, con un valor que oscila entre 18 y 19°C y la mínima se presenta en enero, con una media entre 13 y 14°C (www.inegi.gob.mx).

Particularmente, en Tlaxcala *P. macrolepis* se asocia al bosque de *Abies religiosa*, especie con la que es posible confundirla a primera vista en ausencia de conos; sin embargo, *P. macrolepis* tiene un follaje ralo y copa irregular, mientras que el follaje de *Abies* es denso y su copa cónica (Acosta-Pérez, 1992).

Problemática de la especie. *P. macrolepis*, al igual que el resto de las especies del género *Pseudotsuga* que se encuentran en la República Mexicana están bajo protección especial (DOF, 2001) debido a que sus poblaciones se están deteriorando por diversos factores tales como polinización y fertilización poco eficiente, deficiencia de nutrimentos en el suelo, apertura de nuevas tierras para cultivos agrícolas e incendios forestales (Villalobos et al., 1983; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

Así mismo, existen otros factores que pueden afectar el desarrollo de óvulos, semillas y conos que han contribuido a que *Pseudotsuga* en México esté bajo protección especial, sin

embargo, la mayoría de ellos no están bien entendidos (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Entre los principales factores que afectan la producción de semillas se encuentran las fluctuaciones climáticas bruscas; con relación a esto, se ha reportado que aun en años semilleros si las condiciones climáticas son adversas la producción de semillas es baja (Pérez-Sánchez, 1996).

Otro problema que afecta la capacidad regenerativa de *Pseudotsuga macrolepis*, es la alta cantidad de semillas vanas que se presentan cada año, lo cual fue constatado con un estudio realizado en el estado de Hidalgo, Méx. (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996); una hipótesis que se ha propuesto para tratar de comprender este fenómeno considera a la autopolinización como la causa principal del desarrollo de semillas vanas ya que provoca la manifestación de genes letales y por tanto la muerte de los embriones. Por otra parte, la presencia de semillas vanas también puede tener una explicación adaptativa ya que se considera como una defensa contra su depredación (Wilson, 1983 *vide* Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Aunque, el carácter vano también se ha adjudicado a la depredación por insectos (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Un factor que afecta significativamente la producción de semillas es la depredación ocasionada por aves, roedores e insectos, ya que al alimentarse de los conos de los árboles se destruyen una gran cantidad de semillas (Hedlin *et al.*, 1980; Yañez, 1991; Méndez-Montiel y Zavala-Chávez, 1996).

Méndez-Montiel y Zavala-Chávez (1996) relacionaron la muerte temprana de conillos de *Pseudotsuga macrolepis* a cuatro especies del complejo trips en el estado de Hidalgo, que atacan dichas estructuras durante la polinización ocasionando su muerte; así mismo, encontraron la presencia de *Contarina* sp. y *Megastigmus spermatrophus*. Cabe mencionar que en las poblaciones de *Pseudotsuga* de Estados Unidos, éstas son dos de las principales plagas que afectan la producción anual de semillas (Hedlin *et al.*, 1980; Hermann y Lavender, 1999).

También por la dureza y rectitud de su madera fibrosa, *Pseudotsuga* es talada indiscriminadamente para usos estructurales; uno de los principales usos que se le da a este género es el de árbol de navidad, por lo que la semilla es saqueada para cultivar árboles con esta finalidad (Acosta-Pérez, 1992; Goldfarb y Zaerr, 1989; Baños, 2002). Ante esta problemática, es necesaria la utilización de técnicas que sean efectivas para la propagación de especies como ésta; el Cultivo de Tejidos Vegetales es una alternativa factible por las innumerables ventajas que proporciona.

2- CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV).

Según George (1993) el CTV es la ciencia o **ARTE** de cultivar órganos, tejidos o células vegetales en un medio artificial (*in vitro*) con la finalidad de obtener plantas completas; el cultivo es iniciado con pequeñas fracciones (células, tejidos u órganos) de plantas completas llamados explantes.

Existe una larga historia de intentos para obtener la regeneración de plantas *in vitro*. A principios del siglo XIX Schwann notó que las células de algunas plantas podían ser separadas de éstas y ser inducidas para reconstituir una planta completa. Esta observación permitió dar origen al concepto de totipotencialidad celular que postula, según Schleiden y Schwann (1838 y 1839 respectivamente *fide* Bonga y von Aderkas, 1992) que las células son autónomas y en principio capaces de originar una nueva planta. En la actualidad se ha mencionado que la totipotencialidad es la capacidad que tienen las células de tejidos jóvenes que normalmente no tomarían parte en el proceso de regeneración para originar una planta completa, observando que esta característica puede ser presentada por algunas células diferenciadas pero no por aquellas que se han diferenciado en una estructura (George, 1993).

El CTV se ha convertido en una herramienta invaluable tanto económicamente, como en la recuperación de especies amenazadas, así como para generar conocimiento acerca de los procesos físicos y fisiológicos de las plantas; en la actualidad su uso en horticultura, agricultura y silvicultura está expandiéndose mundialmente (Kozai, 1991).

Murashige (1974) mencionó que es posible aplicar las técnicas de CTV en 4 áreas gracias a las grandes ventajas que ofrece, estas áreas son:

1. La producción de fármacos y otros productos naturales.
2. El mejoramiento genético.
3. Preservación de germoplasma.
4. Multiplicación rápida de clones de variedades seleccionadas.

La propagación de plantas por cultivo de tejidos ofrece muchas ventajas (Tabla 1) en comparación a la propagación vegetativa convencional; no obstante, también presenta desventajas (Tabla 1); sin embargo, aún considerándolas, el uso de CTV es una alternativa de gran importancia para especies que no se pueden propagar convencionalmente (George y Sherrington, 1984) y más aun si se trata de especies amenazadas.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos vegetales.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Con las técnicas de CTV se puede incrementar significativamente la productividad con la producción de genotipos selectos.	Es preciso utilizar métodos específicos para obtener éxito en la producción de cada especie y variedad.
Con el uso de las técnicas de CTV se puede expresar la totipotencialidad de células vegetales y así ofrecer el máximo potencial para la rápida multiplicación.	Las técnicas requeridas para obtener éxito son muy complejas y costosas, ya que se requiere tener infraestructura y equipo especializado.
Los factores que influyen en la regeneración vegetativa (niveles de nutrimentos, reguladores de crecimiento, luz y temperatura, etc.) se pueden ajustar dependiendo de las condiciones que se requieran.	Son comunes: la producción de gases volátiles auto-inhibitorios que causan degeneración de los tejidos por <u>oxidación</u> ; la <u>vitrificación</u> causada por el exceso de humedad en el medio; la presencia de hábitos de crecimiento plagiotrópicos que minimizan el valor de las plantas
Es posible iniciar los cultivos a partir de fragmentos muy pequeñas de plantas.	La velocidad de crecimiento de propágulos durante la multiplicación es relativamente limitada, especialmente para algunas coníferas.
Los requerimientos de espacio y energía son menores para la propagación y mantenimiento de las plántulas <i>in vitro</i> en comparación a la propagación <i>ex vitro</i> .	Para mantener <i>in vitro</i> a los explantes, es necesario que sean cultivados en medios con sacarosa u otras fuentes de carbono por lo que las plantas al ser transferidas a un medio <i>ex vitro</i> no son capaces de producir sus propios nutrimentos por fotosíntesis, es decir no son autótrofas.
La producción puede continuar todo el año; siendo independiente del cambio de estación, o de los ciclos de vida de la planta.	Los porcentajes de enraizamiento y la sobrevivencia durante este periodo y el de aclimatización son muy bajos.
Es posible la producción de clones de algunas plantas que son lentas, difíciles o hasta imposibles de propagar vegetativamente logrando la reducción de los ciclos de vida de las especies, principalmente forestales.	La susceptibilidad a perder humedad fuera de los envases de cultivo es mayor que si se cultivara en condiciones ambientales desde los inicios de su cultivo y la posibilidad de producir plantas con aberraciones genéticas es mucho mayor.
La propagación es ideal para producir plantas libres de patógenos.	

Fuente: Vargas-Hernández, 1982; Mohammed y Vidaver, 1988; Kozai, 1991; Thorpe y Harry, 1991; Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Attree y Fowke, 1993; George, 1993; Laukkanen *et al.*, 1999.

Técnicas de CTV. La propagación vegetativa de plantas puede ser lograda mediante alguna de tres técnicas: 1) elongación de brotes axilares, 2) proliferación de botes adventicios y 3) embriogénesis somática; las dos primeras permiten la formación de brotes unipolares que posteriormente deben ser enraizados en un proceso de varias etapas y se conoce como organogénesis; por su parte la embriogénesis somática permite la formación de embriones bipolares por medio de un proceso similar al de embriogénesis cigótica (Lin *et al.*, 1991; Thorpe *et al.*, 1991; Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993). Cabe señalar que el potencial de formación de un gran número de plantas *in vitro* se incrementa según la técnica utilizada de acuerdo al orden mencionado, no obstante, también incrementa la dificultad para obtener plantas completas.

En general, los eventos que ocurren durante CTV puede dividirse en diferentes fases basadas en la respuesta de los explantes en cultivo, estas son: a) preinducción (desdiferenciación), este proceso es logrado mediante un estímulo externo ocasionado principalmente por la presencia de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en el medio de cultivo; b) inducción o determinación y c) expresión; generalmente estas últimas fases se presentan en medios libres de RCV (Thorpe y Kumar, 1993 *fide* Ahuja, 1993).

2.1- Organogénesis

Esta es la principal vía usada para la regeneración *in vitro* de leñosas; es definitivamente la vía con la que se han obtenido más resultados y con frecuencia es el método preferido para la producción a gran escala de muchas especies de árboles. Con esta técnica de micropropagación se pueden inducir órganos nuevos, como brotes y raíces a partir de tejidos de plantas cultivados *in vitro*; tales órganos recién originados se denominan adventicios (Bonga y von Aderkas, 1992); los órganos o tejidos de los que ha sido posible obtener estructuras adventicias en angiospermas y gimnospermas son: embriones, vástagos, raíces, flores, brotes florales y partes del perianto (George, 1993).

La organogénesis se puede obtener mediante elongación de brotes axilares y proliferación de botes adventicios, siendo este último comúnmente usado para micropropagación de coníferas (Thorpe *et al.*, 1991; Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

Proliferación de brotes adventicios. Esta técnica puede ser indirecta es decir, con la formación previa de callo sobre el cual se originan las estructuras adventicias o directa, que se refiere a la formación de estructuras adventicias directamente sobre el explante;

este último es el método comúnmente utilizado para coníferas ya que la capacidad regenerativa de callos obtenidos *in vitro* se pierde velozmente, a la vez que, se ha observado que la previa formación de callo incrementa la posibilidad de producir plantas anormales (Thorpe y Harry, 1991).

Este proceso incluye la inducción de tejidos meristemáticos por tratamientos con RCV, permitiendo la diferenciación y el desarrollo de brotes (Thorpe *et al.*, 1991). Cabe mencionar que a pesar de que los principios básicos para la obtención de brotes adventicios vía organogénesis han sido establecidos, los requerimientos óptimos para cada una de estas etapas debe ser determinada empíricamente para cada especie y aún para cada explante (Thorpe *et al.*, 1991). Las etapas para la producción de brotes adventicios son cuatro; generalmente tres de ellas se realizan *in vitro* y la última *ex vitro* (Murashige, 1974) (Fig. 7):

i) Inducción de brotes. En esta etapa se presenta la inducción de tejido meristemático como respuesta a la exposición de RCV, usualmente auxinas y citocininas (Bonga y von Aderkas, 1992), permitiendo la diferenciación de primordios y desarrollo de brotes. La 6-benciladenina (BA) en concentraciones superiores a los 25 μ M es el RCV usado comúnmente para la inducción de brotes adventicios tanto para angiospermas como para gimnospermas y en muchos casos el único requerido (Thorpe *et al.*, 1991); no obstante, algunas especies requieren de la adición de auxinas en bajas concentraciones, esto es importante ya que se ha observado que altas concentraciones de estos últimos RCV tienden a aumentar la proliferación de callo, principalmente en coníferas.

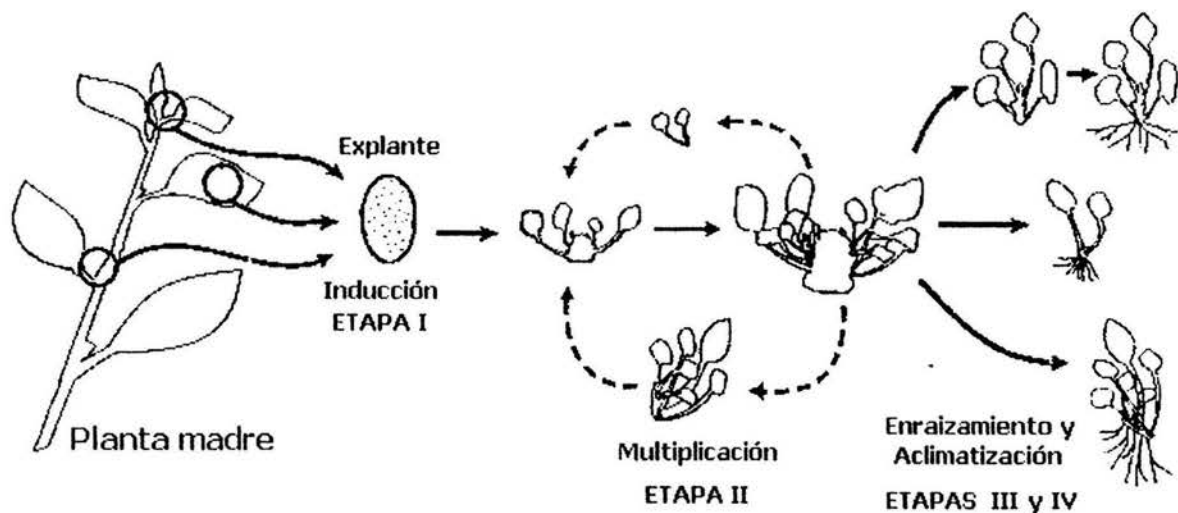


Figura 7. Proceso general de la producción de brotes adventicios.

Fuente. George, 1993 (modificado)

ii) Multiplicación e individualización de los brotes. En coníferas, este proceso incluye el desarrollo de tejido medular durante la inducción de brotes o vástagos con hojas primarias y su subsiguiente multiplicación. En general, no es requerida la adición de RCV en esta etapa (Thorpe y Harry, 1991).

iii) Enraizamiento. La etapa de enraizamiento es la más importante de todo el proceso organogenético (George, 1993); sin embargo, la incapacidad de muchas plantas, especialmente de coníferas, para inducir raíces adventicias ha sido un factor limitante para la producción, clonación y/o recuperación (Mohammed y Vidaver, 1988; Hassing *et al.*, 1992). Este problema, es frecuente en gimnospermas cuya maduración es acompañada de la reducción de la capacidad de enraizamiento (Davis *et al.*, 1998 *fide* Hassing *et al.*, 1992).

iv) Aclimatización. En esta última etapa, las plántulas son transferidas de un medio *in vitro* a uno *ex vitro*; los métodos usados para la transferencia de las plántulas son muy importantes y si no son manejados con extremo cuidado pueden dar como resultado una pérdida significativa de material propagado por dos motivos: a) los vástagos son cultivados *in vitro* con una alta humedad, y con frecuencia los estomas de las hojas producidas bajo estas condiciones son anormales e incapaces de cerrarse lo que ocasiona pérdida de agua y la muerte de la plántula (Aboel-Nil, 1987; George, 1993); b) cuando en el cultivo de plántulas se ha adicionado una fuente alta de carbohidratos (comúnmente sacarosa) y mantenido con una baja intensidad luminosa, estas plántulas no son dependientes de su propia fotosíntesis (George, 1993).

3- EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual células somáticas se diferencian en embriones que son llamados somáticos (von Arnold *et al.*, 2002). Morfológicamente los embriones somáticos (ES) son parecidos a los embriones cigóticos: son bipolares, tienen radícula, hipocótilo y cotiledones (Fig. 4).

La embriogénesis somática en gimnospermas ha sido obtenida en una gran variedad de cíadas (Chávez *et al.*, 1992 a, b y c; Norstog y Rhamstine, 1967 *fide* Attree y Fowke, 1993) y en un menor número en especies de coníferas (Tabla 2) (Attree y Fowke, 1991; Attree y Fowke, 1993; Raemakers *et al.*, 1999). Las primeras descripciones del proceso de embriogénesis somática para cíadas fueron descritas por LaRue (1948, 1954 *fide* Attree y Fowke, 1993) y para coníferas por Hakman (1985 *fide* Attree y Fowke, 1993) y Chalupa (1985 *fide* Attree y Fowke, 1993). En los últimos años, se han realizado diversos trabajos de embriogénesis somática con gimnospermas usando como explantes principalmente embriones cigóticos inmaduros, maduros y megagametofitos; en general, mientras más joven es el explante, más fácil es inducir la embriogénesis somática (Bonga y von Aderkas, 1992).

A pesar del gran número de trabajos reportados para la regeneración de especies utilizando este método de propagación *in vitro*, la embriogénesis somática se obtiene con muy poca frecuencia en comparación con otros métodos de regeneración, particularmente en especies maderables. Para coníferas esta técnica está limitada al uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes (Thorpe y Harry, 1991) y estos están disponibles sólo en ciertas temporadas. Además, con frecuencia las semillas son difíciles de disectar y cultivar debido a su pequeño tamaño (Bonga y von Aderkas, 1992).

No obstante esta técnica ofrece ventajas entre las que destacan: la posibilidad de propagar a gran escala utilizando biorreactores; además, en la mayoría de los casos los ES o los cultivos embriogénicos pueden ser criopreservados lo cual hace posible establecer bancos de germoplasma (von Arnold *et al.*, 2002).

Por otro lado, Boulay (1987 *fide* Thorpe *et al.*, 1991; Thorpe y Harry, 1991) menciona que grandes cantidades de ES pueden ser almacenados relativamente fácil en cultivos líquidos y es posible encapsularlos con geles y sustancias nutritivas para más tarde ser usados como semilla sintética (Bonga y von Aderkas, 1992; Rao y Bapata, 1993).

Tabla 2. Inducción de embriogénesis somática en coníferas.

Especie	Explante usado	Resultado	Referencia
<i>Abies alba</i>	A		Schuller <i>et al.</i> , 1989
<i>Larix decidua</i>	C	EH	Nagmani y Bonga, 1985; von Aderkas <i>et al.</i> , 1988; von Aderkas y Bonga, 1988.
<i>L. eurolepis</i>	A	CED	Klimaszewska (1989); von Aderkas <i>et al.</i> , 1990.
<i>Picea abies</i>	A, B, C, D	ES EH	Hakman <i>et al.</i> , 1985; Hakman y von Aderkas, 1985; Gupta y Durzan, 1986; Jain <i>et al.</i> , 1988; Verhagen y Wann, 1989; von Arnold y Hakman, 1986; von Arnold, 1987; Krogstrup, 1986; Luelu <i>et al.</i> , 1987; Becwar <i>et al.</i> , 1987; Wann <i>et al.</i> , 1987; Simola y Santanen, 1990.
<i>Picea mariana</i>	A, B, D	ES	Hakman y Fowke, 1987; Tautorus <i>et al.</i> , 1990; Attree <i>et al.</i> , 1990.
<i>Picea glauca</i>	A, B, D	ES	Attree <i>et al.</i> , 1989; Hakman y Fowke, 1987; Lu y Thorpe, 1987; Tremblay, 1990; Attree <i>et al.</i> , 1990.
<i>P. glauca</i> , <i>P. engelmanni</i> y algunos híbridos intermedios	A	ES	Webb <i>et al.</i> , 1989
<i>Picea sitchensis</i>	A, B	ES	Krogstrup <i>et al.</i> , 1988; von Arnold y Woodward, 1988.
<i>Pinus caribaea</i>	A	ES	Lainé y David, 1990
<i>Pinus elliotti</i>	A	ES	Jain <i>et al.</i> , 1989
<i>Pinus lambertiana</i>	B	ES	Gupta y Durzan, 1986
<i>Pinus radiata</i>	A	ES	Chandler <i>et al.</i> , 1989
<i>Pinus strobus</i>	A	ES	Finer <i>et al.</i> , 1989
<i>Pinus taeda</i>	A	ES	Gupta y Durzan, 1987; Becwar <i>et al.</i> , 1990 y 1991.
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	A, B	ES	Durzan y Gupta, 1987
<i>Sequoia sempervirens</i>	D	ES	Bourgkard y Favre, 1988.

A: Embriones cigóticos inmaduros; B: Embriones cigóticos maduros; C: Megagametofitos; D: Plántulas de algunos días de germinadas. EH: Embriones Haploides; CED: Callo Embriogénico Diploide; ES: Embriones Somáticos.

FUENTE: Attree y Fowke, 1991; Tautorus *et al.*, 1991.

Además, para especies que se encuentran limitadas a pequeñas poblaciones y en peligro de extinción, la embriogénesis somática es una alternativa de gran importancia ya que una vez establecida la técnica ofrece ventajas significativas sobre la micropropagación vía organogénesis para la producción de plantas a gran escala: potencialmente permite la regeneración de una gran número de propágulos en menor tiempo, lo que disminuye los costos de producción en comparación a la producción de plantas vía brotes adventicios (Aboel-Nil, 1987; Attree y Fowke, 1991; Thorpe y Harry, 1991). También con la embriogénesis no se requiere de la etapa de inducción de raíz en forma separada, siendo esta última una de las ventajas más importantes debido a las dificultades para enraizar brotes adventicios (Bonga y von Aderkas, 1992).

3.1 Embriogénesis cigótica y somática.

Sí solo una célula (totipotente) es considerada como equivalente o similar a un cigoto, entonces las primeras etapas de desarrollo de un embrión somático pueden ser comparadas con las de embriones cigóticos (Attree y Fowke, 1991; George, 1993; Nagmani *et al.*, 1995), no obstante, es importante señalar que los patrones de desarrollo de ES no siguen exactamente los mismos patrones de desarrollo de los embriones cigóticos (Nagmani *et al.*, 1995) (Fig. 8 y 9)

Por otro lado, en muchos reportes existe la confusión con respecto a la terminología para identificar y clasificar las diferentes etapas del desarrollo de embriones de coníferas, ya que se usan las mismas que para angiospermas como son: etapa globular, etapa de corazón, etapa de torpedo, siendo que los patrones de división celular en un cigoto de coníferas durante la embriogénesis temprana y la embriogénesis tardía es morfológica y anatómicamente diferente al de angiospermas (von Arnold *et al.*, 2002).

La secuencia del desarrollo embrionario cigótico de gimnospermas puede dividirse en tres fases:

- A. Proembriogénica: todas las etapas antes de la elongación del suspensor.
- B. Embriogénesis temprana (precotiledonaria): todas las etapas después de la elongación del suspensor y antes del establecimiento del meristemo radicular.
- C. Embriogénesis tardía (cotiledonaria): histogénesis intensiva incluyendo el establecimiento del meristemo apical y radicular.

- En general los eventos que suceden durante estas etapas son:

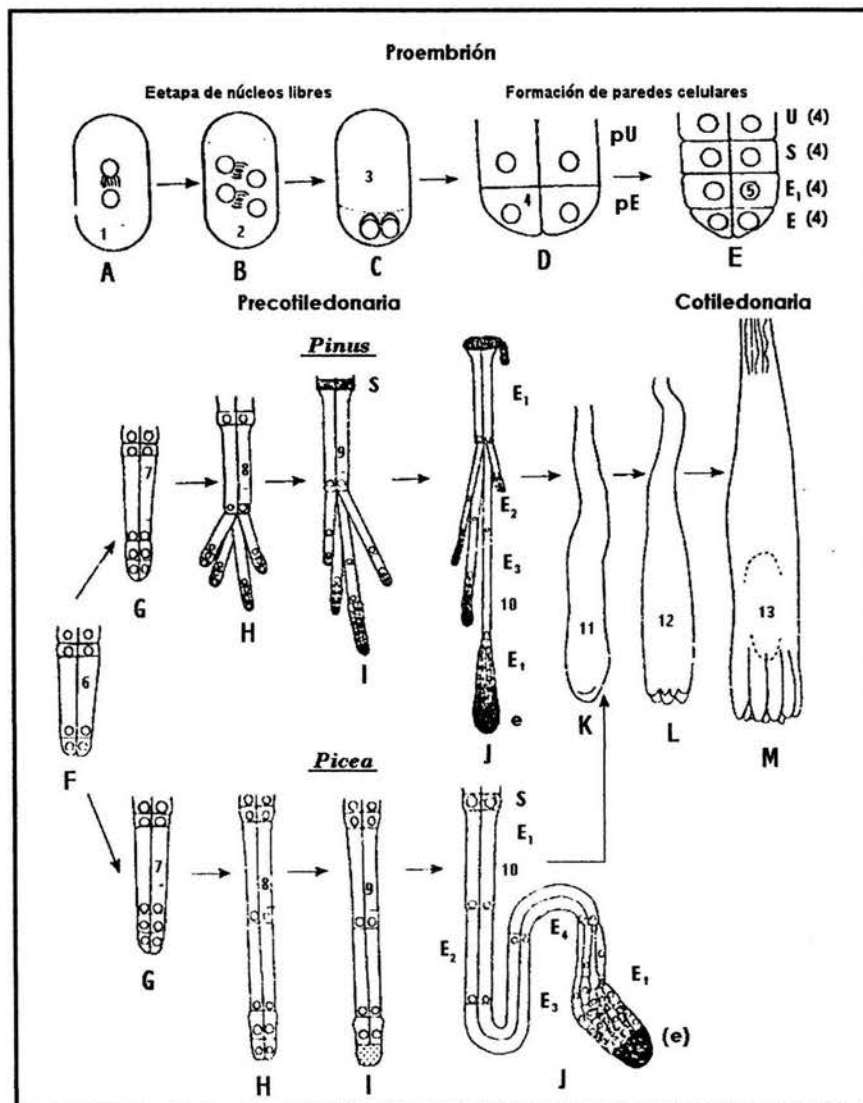


Figura 8. Embriogénesis cigótica de *Pinus* y *Picea*.

Fuente: (Nagmani *et al.*, 1995).

A. ETAPA DE PROEMBRIÓN (Fig. 8 A-E).

- Después de la fertilización, el núcleo del cigoto se divide formando dos, cuatro, ocho núcleos libres que migran a la base del arquegonio; siendo esta una de las diferencias más importantes de la gimnospermas con respecto a las angiospermas, en las que la pared celular es formada inmediatamente después de la primera división del cigoto (Kong *et al.*, 1999).
- Se forman la paredes celulares convirtiéndose en un proembrión de ocho células arregladas en dos capas, denominadas capa primaria superior (Fig. 8 pU por sus siglas en inglés primary upper tier) y capa primaria embrional (Fig. 8 pE) de cuatro células cada una (Nagmani *et al.*, 1995).

- En un proceso de división interna en ambas capas se forma un proembrión con cuatro capas de cuatro células cada una: la capa superior (denominado U por sus siglas en inglés upper); el suspensor (Fig. 8 S); el primer segmento embrionario (Fig. 8 E₁) y células embrionarias (Fig 8 E).

B. ETAPA PRECOTILEDONARIA (Fig. 8 F-K).

- Después de la elongación de E₁ y la división del segmento E se inicia la segunda etapa de desarrollo denominada precotiledonaria y donde se presenta algún tipo de poliembrionía.

En la familia Pinaceae, dependiendo del género, los embriones pueden seguir diferentes direcciones en cuanto al tipo de poliembrionía que presente y puede ser: a) poliembrionía por división o gemación y b) poliembrionía simple; cabe mencionar que esta es otra característica especialmente de gimnospermas.

a) Poliembrionía por división o gemación: múltiples embriones se originan de un cigoto; está representada en los géneros *Pinus*, *Cedrus*, *Keteleeria*, *Tsuga* y *Abies*. Esta etapa inicia con la elongación de la capa E₁ seguida por la división de las células de la capa E resultando la capa E₂. Esto es seguido por la división o gemación de las células de la capa E₂ en una o varias unidades y posteriormente se da la elongación de las mismas. En los dos tipos de poliembrionía repetidas divisiones seguidas por elongaciones dan como resultado la formación de una capa E₃ (Fig. 8 J *Pinus*).

b) Poliembrionía simple: ocurre cuando varios huevos de un sólo gameto son fertilizados independientemente y forman embriones separados sin división o gemación. Se considera que es el tipo más primitivo y el más común, se encuentra representado en los géneros *Picea*, *Larix*, *Pseudolarix* y ***Pseudotsuga*** (Attree y Fowke, 1993). En este tipo ocurren divisiones celulares seguidas por elongaciones al igual que lo descrito para *Pinus* sp., sin embargo, la división o gemación que ocurren en E₂ no sucede (Fig. 8 J *Picea*).

- En ambos tipos los segmentos E₁ E₂ y E₃ se elongan para constituir el sistema suspensor. Esto es seguido por la formación de células proximales en la base de las células embrionales (e) las cuales se elongan irregularmente, no forman capas y son designadas como E₄ (Fig. 8 J).

El desarrollo subsiguiente de los embriones depende de su posición en el óvulo. Usualmente un embrión dominante es el que desarrolla y llega hasta la etapa cotiledonaria, el resto de los embriones se detiene en alguna etapa y más tarde son absorbidos (Raven *et al.*, 2000; Raghavan y Sharma, 1995).

C. ETAPA COTILEDONARIA (Fig. 8 L y M).

- Cuando los embriones entran en esta etapa, alrededor del extremo superior aparecen los primordios cotiledonarios formando un anillo.
- Las etapas que le siguen a esta última, constan del incremento de la longitud del hipocótilo y cotiledones.

Cabe señalar, durante la embriogénesis un gran número de genes deben ser expresados de una manera muy coordinada para asegurar que la célula llamada cigoto se desarrolle en una estructura multicelular perfectamente organizada. Más de 3×10^4 diferentes genes son expresados en el embrión y en la plántula (von Arnold *et al.*, 2002). Se ha estimado que cerca de 3500 diferentes genes son necesarios para completar el desarrollo embrionario, sin embargo, los estudios de la regulación génica durante el desarrollo del embrión es limitado debido a la poca accesibilidad al embrión, particularmente en etapas tempranas de desarrollo.

3.2 Etapas de embriogénesis somática.

Se ha demostrado que al igual que en todas las gimnospermas y angiospermas que comienzan su vida a partir de una sola célula (el huevo fertilizado o cigoto), los ES pueden originarse a partir de una sola célula (George, 1993; Raghavan y Sharma, 1995). La embriogénesis somática es un proceso de regeneración que consiste de varias etapas (Fig. 9) (von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003).

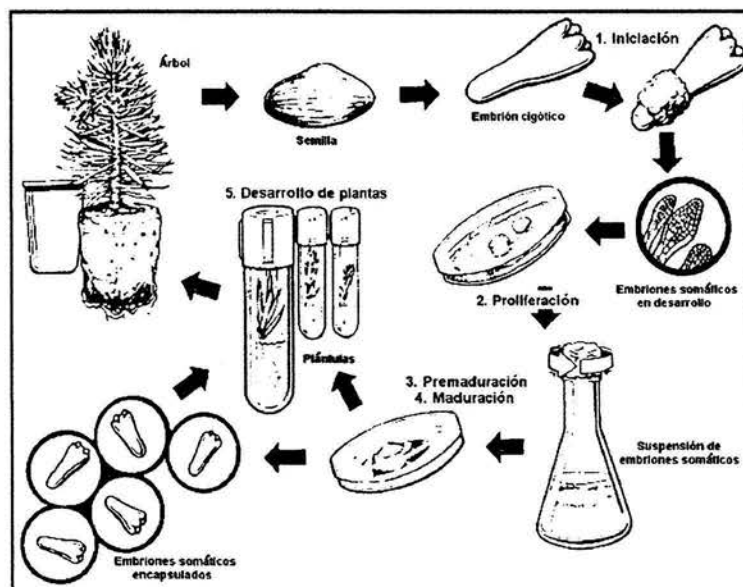


Figura 9. Etapas de embriogénesis somática Fuente: Dunstan *et al.*, 1995

A. Iniciación del cultivo embriogénico.

La inducción de tejido embriogénico en coníferas es estrictamente dependiente del explante que se use (Brown *et al.*, 1995; Stasolla y Yeung, 2003), los principales explantes utilizados para la inducción de ES son: megagametofito sin embrión; megagametofito con embrión cigótico; embrión cigótico en etapa precotiledonaria; embrión en etapa cotiledonaria, obtenidos de semillas de conos frescos y de semillas almacenadas; explantes de plántulas (como cotiledones o hipocótilo de embriones de algunos días de germinados).

En coníferas generalmente se usan embriones cigóticos inmaduros como explantes (Attree y Fowke, 1991; Tautorius *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Attree y Fowke, 1993). El éxito de la utilización de embriones cigóticos sugiere que la información requerida para la formación de cultivos embriogénicos esta inicialmente presente en el explante; (Yeung, 1995). Raemakers *et al.* (1999) menciona que el hecho de que se usen embriones cigóticos inmaduros puede ser explicado porque algunos genes para iniciar la embriogénesis se encuentran expresándose en esta etapa en comparación con embriones cigóticos maduros; de esta forma, es posible que la llave de la manipulación exitosa sea inducir el explante a dividirse mientras mantiene las propiedades embriogénicas (Yeung, 1995).

Así mismo, en el proceso de embriogénesis la redirección del programa normal de desarrollo esta relacionado con la adquisición de la competencia que esta relacionada con la capacidad de las células del explante a responder a señales antes de llegar a tomar una ruta de desarrollo determinada (Brown *et al.*, 1995; Yeung, 1995; Joy IV y Thorpe, 1999); la competencia puede ser iniciada con tratamientos antes o después de la escisión del explante (Yeung, 1995).

El cultivo embriogénico usualmente inicia colocando al explante en un medio artificial solidificado y adicionado con RCV, principalmente auxinas, en algunas ocasiones en combinación con concentraciones bajas de citocininas (Attree y Fowke, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Attree y Fowke, 1993; George, 1993; Stasolla y Yeung, 2003). Con respecto a esto, es importante mencionar que la auxina comúnmente usada para la inducción de ES es el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); sin embargo, en algunas ocasiones el uso de este RCV así como el prolongado mantenimiento de callo puede ocasionar variaciones epigenéticas.

Por otro lado, los requerimientos de auxinas del explante están determinados por la etapa de desarrollo del mismo (Bonga y von Aderkas, 1992; von Arnold *et al.*, 2002). Según Lo Schiavo *et al.* (1989 *fide* von Arnold *et al.*, 2002) es posible que las auxinas adicionadas en el medio de cultivo influyan en la metilación del ADN de los genes del explante, de esta forma se detiene la expresión génica del explante y es reemplazada con un programa de expresión génica embriogénica.

Así mismo, se ha propuesto que los RCV y el estrés juegan un papel central en la mediación de la cascada de transducción de señales que permite reprogramar la expresión génica. Esto origina una serie de divisiones celulares que inducen un crecimiento desorganizado de callo o un crecimiento polarizado permitiendo la embriogénesis somática. Además de la adición de RCV, factores tales como pH, agente solidificante, nivel de nitrógeno pueden afectar la generación de tejido embriogénico (Tautorus *et al.*, 1991).

La etapa de inducción finaliza después de varias semanas de cultivo en oscuridad, cuando se presenta tejido embriogénico; el tiempo de aparición depende de la especie y el genotipo (Stasolla y Yeung, 2003). Una vez que las células embriogénicas han sido formadas, continúan proliferando, formando masas proembriogénicas; las auxinas son requeridas para la formación de estas masas, no obstante, inhiben el desarrollo de ES. En esta etapa, el callo embriogénico es mantenido y prolifera en un medio de cultivo igual al usado para la inducción. Para obtener un alto porcentaje de proliferación se recomienda el uso de medios líquidos, además, con este tipo de cultivos el desarrollo de las células se hace más sincronizado (Stasolla y Yeung, 2003).

Para estimular el crecimiento de ES es necesario transferir los cultivos a un medio nutritivo (generalmente el mismo usado desde el inicio) sin RCV y realizar subcultivos cada 10-15 días si se trata de medios sólidos y cada 7 días en medios líquidos; además, se ha reportado que con periodos prolongados de cultivo la presencia de variaciones somaclonales se incrementa, así mismo, el potencial embriogénico baja o se pierde eventualmente en la mayoría de los casos (Stasolla y Yeung, 2003).

B. Maduración de los ES

Durante esta etapa los ES sufren varios cambios tanto morfológicos como bioquímicos; los órganos de almacenamiento que son los cotiledones se expanden simultáneamente con la deposición de ciertos productos. La acumulación de materiales de almacenamiento como proteínas, lípidos, almidón y también proteínas específicas de la embriogénesis

tardía (las cuales se piensa están involucradas en la adquisición de la tolerancia a la desecación), está controlada, entre otros procesos por la acumulación de mARNs; tal acumulación está provocada por la activación de ciertos genes que responden al ácido abscísico (ABA) (Attree y Fowke, 1993). El ABA es comúnmente usado durante esta etapa, para estimular la maduración; en coníferas es necesario tratar con este RCV, usualmente en concentraciones 10–50 μ M adicionadas al medio de cultivo por periodos de aproximadamente un mes. En algunas especies, los tratamientos de maduración son seguidos por una desecación parcial del medio que aumenta la frecuencia de germinación de los ES (Stasolla y Yeung, 2003).

C. Desarrollo de plántulas.

En esta etapa, únicamente los ES con morfología normal, que hayan acumulado suficientes productos de almacenamiento y hayan adquirido la tolerancia a la desecación al finalizar la etapa de maduración se desarrollan, dando origen a plantas normales, generalmente en medios sin RCV; no obstante, en ciertos casos se requiere de la adición de auxinas y citocininas para estimular la geminación (von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003).

Cabe señalar que durante los últimos 15 años los estudios del mejoramiento del proceso de embriogénesis somática han estado dirigidos principalmente a las etapas de maduración y germinación de embriones.

Por otro lado, es de gran importancia mencionar que recientemente en una gran cantidad de trabajos de CTV son utilizadas técnicas histológicas ya que tienen como propósito fundamental el estudio de los eventos ontogénicos y cambios estructurales (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992; Chávez, 1993; Ogita *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 1999; entre otros).

Esta herramienta de suma importancia es usada para el estudio de la morfogénesis, organización y cambios que se presentan dentro del sistema experimental (Yeung, 1999); por ejemplo y refiriéndonos concretamente al proceso de embriogénesis somática es muy común la falta de demostración de meristemas bien definidos, mostrar una forma parecida a un embrión somático no es suficiente para asegurar que se han obtenido; para lo cual las técnicas histológicas han demostrado ser eficientes y exactas (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

4- CTV DEL GÉNERO *Pseudotsuga*.

Organogénesis:

Se han realizado diversos trabajos para la obtención de brotes adventicios de *Pseudotsuga*, utilizando diferentes medios de cultivo como MS, B5, B5 modificado por Litz y SH y diferentes tipos de explantes, entre los que destacan embriones cigóticos maduros y cotiledones, ya que son con los que se han obtenidos los mejores resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios *in vitro* de inducción de brotes adventicios del género *Pseudotsuga*.

REFERENCIA	TRATAMIENTO.
Cheng (1975 <i>fide</i> AboEl-Nil, 1987)	MS con 5.0 μ M de AIA e AIB +0.5 a 1.0 mM de BA o 2iP.
Sommer (1975 <i>fide</i> AboEl-Nil, 1987)	LS con 0.4 a 70 μ M de BA.
Winton y Verhagen (1977 <i>fide</i> Goldfarb y Zaer, 1989)	BL modificado, con 0.1 a 0.5 mg/l de BAP.
Cheng, 1977; Cheng y Voqui, 1977	CH (MS modificado), con 5 μ M de BAP + 0.5 a 5 nM de ANA.
Mapes (1981 <i>fide</i> Goldfarb y Zaer, 1989)	SH con 1 mg/l de BAP + 0.25 mg/l de ANA ó 2,4-D
Chalupa (1977 <i>fide</i> AboEl-Nil, 1987)	LS reducido al 50% con 1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA
Thompson (1982 <i>fide</i> Goldfarb y Zaer, 1989)	MS reducido al 50%, bajo en nitrógeno con 10^{-7} M de ANA + 10^{-5} M de BAP.
Chalupa (1983 <i>fide</i> Goldfarb y Zaer, 1989)	MS bajo en nitrógeno con 1 a 2 mg/l de BAP + 0.005 a 0.01 mg/l de ANA.
Gupta y Durzan, 1985	DCR con 2 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de ANA
Galindo Flores, 1996	MS y B5 modificado por Litz, con mayor respuesta morfogenética en los tratamientos con altas concentraciones de BA con respecto a las de ANA
García Campusano, 1999	B5 modificado por Litz y SH con 16 tratamientos con diferentes concentraciones reguladores de crecimiento (ANA/BA y 2,4-D/K).
Monjarás, 2001	Medio SH con BA o K 3 y 5 mg/l + 2,4-D o ANA 0, 0.1 y 0.5 mg/l

ABREVIATURAS USADAS: MS, medio nutritivo de Murashige y Skoog; LS, medio nutritivo de Linsmaier y Skoog; BL, medio nutritivo de Brown y Lawrence; CH, medio nutritivo de Cheng; SH, medio nutritivo de Schenk y Hildebrandt; DCR, medio nutritivo de Gupta y Durzan. REGULADORES DE CRECIMIENTO: AIA, ácido 3 indolacético; AIB, ácido 3 indolbutírico; BA, benciladenina; 2iP, 2 isopentiladenina; BAP, N-6-benzilaminopurina; ANA, ácido naftalenacético; 2,4-D, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Las concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas han sido diversas y muy variadas (Tabla 3); sin embargo, en general las concentraciones de citocininas son

mayores con respecto a las de auxinas; con respecto a esto, Monjarás (2001) observó para *P. macrolepis* que la adición de auxinas (ANA y 2,4-D) en la fase de inducción de brotes fue indistinta, el factor determinante fue el uso de las citocininas (BA y K); con las combinaciones de 2,4-D/K se obtuvieron brotes en un periodo más corto de tiempo con respecto a los de ANA/BA; la mayor cantidad de brotes útiles (disectados e individualizados) se presentó en los tratamientos que contenían 2,4-D y K.

Además, se han realizado diversos experimentos de enraizamiento principalmente con la especie *P. menziesii* y algunos con *P. macrolepis* (tabla 4).

Tabla 4. Estudios sobre el enraizamiento *in vitro* del género *Pseudotsuga*.

REFERENCIA	TRATAMIENTO
Cheng, 1975 y 1978; Cheng y Voqui, 1977	0.05 mg/l de ANA en el medio al 50% con 5 g/l de sacarosa y agar durante 4 semanas.
Cheng, 1977.	2iP (5.0-0.5 mM) y ANA (0.5-0.25mM), solidificando el medio con agar.
Chalupa. 1983	2 mg/l de AIB + 2 mg/l de ANA en el medio durante 25 días.
Timms y Ritchie, 1984	0.05 mg/l de ANA en el medio, con 5 g/l de sacarosa y agar, por 8 semanas.
Gupta y Durzan, 1985	Vástagos maduros: 3 mg/l de ANA y para vástagos jóvenes 2 mg/l de ANA.
Mapes <i>et al.</i> , 1981	0.1 mg/l de ANA con 0.1 mg/l de 2iP.
Boulay, 1979	10-20 mg/l de AIA + 1-5 mg/l de ANA, medio reducido al 50% con 5 g/l de sacarosa y agar
Winton y Verhagen, 1977	10 mg/l de AIB en un pulso
Boulay, 1979	10-3 – 10 mg/l de AIA + 10-2 – 1 mg/l de ANA, medio reducido al 50%, 5 g/l de sacarosa y solidificado con agar.
Galindo-Flores, 1996	1mg/l de ANA, 0.1mg/l de ANA + 6mg/l de BAP, y 3 y 5 mg/l de AIB, en el (SH) medio reducido al 50% con 3 m/g de sacarosa.
García-Campusano, 1999	40mg/l de ANA pulso de 20 hrs.; 40mg/l de AIB pulso de 20 hrs. 20mg/l de ANA + 20 mg/l de AIA pulso de 20 hrs. Con SH reducido al 50%; 10mg/l de AIB pulso de 72 hrs. en MS
Monjarás, 2001	SH, MCM, puentes de papel, turba-verm. (1:1). Citowin 500; Radix 10000; ANA 0.6, 0.5, 0.4, 0.2, 0.05 mg/l; 0.25 µM; 0.5 µM +2iP 5.0 µM y 0.5 mM; AIB 10 mg/l y 1mM (total 27 trat.)

Fuente: Mohammed y Vidaver, 1988; Goldfarb y Zaer, 1989; Aboel Nil, 1977; Cheng, 1977; Cheng y Voqui, 1977; Thorpe y Harry, 1991; Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001. ABREVIATURAS USADAS: MS, medio nutritivo de Murashige y Skoog; SH, medio nutritivo de Schenk y Hildebrandt. REGULADORES DE CRECIMIENTO: AIA, ácido 3 indolacético; AIB, ácido 3 indolbutírico; 2iP, 2 isopentiladenina; BAP, N-6-benzilaminopurina; ANA, ácido naftalenacético.

Monjarás, (2001) observó para *Pseudotsuga macrolepis* que en el tratamiento que contenía una mezcla de turba/vermiculita (1:1) se obtuvo el 100% de mortandad de los brotes en un periodo de 2-7 meses, debido a causas tales como falta de humedad y acidificación del medio; el uso de ANA para la inducción de raíces para esta especie fue adecuado ya que se obtuvo la formación de primordios radicales en los tratamientos: ANA 0.25 μ M, ANA 0.05 mg/l y ANA 0.4 mg/l; con Citowin 500® (3 y 6 %) se generó una gran cantidad de callo sobre todo el brote, deformándolo e impidiendo la formación de raíces adventicias en la mayoría de los brotes; la concentración de sacarosa (5g/l), así como la temperatura (19°C), en los tratamientos de enraizamiento fueron determinantes en la sobrevivencia de los brotes, ya que con concentraciones menores de sacarosa y a mayor o menor de temperatura se presentaba una cantidad considerable de brotes muertos. Con esto se comprobó que la etapa de enraizamiento es una de las más difíciles de todo el proceso organogénico en coníferas y en especial para *P. macrolepis*.

Embriogénesis somática:

Con respecto al género *Pseudotsuga*, se han reportado algunos trabajos de embriogénesis somática con la especie *P. menziesii*; se han usado como explantes embriones cigóticos inmaduros y maduros, obteniendo 25 y 0.1 % de tejido embriogénico respectivamente; la embriogénesis fue inducida en el medio nutritivo MS reducido al 50% de sus componentes inorgánicos, adicionado con 2,4-D (50 μ M); K (20 μ M) y BAP (20 μ M); solidificado con 6% de bactoagar (Durzan y Gupta, 1987). También se han utilizado segmentos de cotiledones, a partir de los cuales se han obtenido ES inducidos en el medio MS adicionado con 5.3 μ M de ANA o 4.5 μ M de 2,4-D sin citocininas (Aboel-Nil, 1980 *fide* Aboel-Nil, 1987). Así mismo, se ha logrado la formación de ES a partir de cultivos en suspensión, en medios con concentraciones bajas de calcio, sin nitrógeno y adicionados con ANA (Durzan, 1982, *fide* Aboel-Nil, 1987).

5- JUSTIFICACIÓN

P. macrolepis es una conífera sujeta a protección especial NOM-059-ECOL-2001 (DOF, 2001) debido a que sus poblaciones escasas y de pocos individuos se encuentran gravemente afectadas principalmente por la tala inmoderada para la apertura de nuevas zonas de cultivo, a la baja regeneración natural, incendios forestales y la deficiente fertilización (Méndez-Montiel y Zavala-Chávez 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996); aunado a esto, los procedimientos convencionales para su propagación han resultado poco prácticos y efectivos.

Existen trabajos de regeneración *in vitro* vía organogénesis (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001), en donde se ha reportado la inducción de brotes adventicios a partir de embriones cigóticos maduros. Sin embargo, uno de los problemas de estos órganos es su unipolaridad, que dificulta su posterior enraizamiento. Por tal motivo se propone establecer una metodología para la obtención de ES ya que la etapa de enraizamiento sería omitida debido a las características de bipolaridad de los embriones.

6- OBJETIVOS

6.1- General:

Explorar la posibilidad de formación de embriones somáticos a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros y maduros de *P. macrolepis* con un amplio barrido de la combinación de 2,4-D y K.

6.2- Específicos:

- Asociar el estado de desarrollo de los conos recolectados con la presencia y estado de desarrollo de los embriones de *P. macrolepis*.
- Describir y registrar las respuestas morfogenéticas de embriones cigóticos en distinto estado de desarrollo cultivados *in vitro*.
- Establecer condiciones de cultivo *in vitro* (medios de cultivo, concentraciones de reguladores de crecimiento, así como condiciones de incubación y tiempo de inducción) para la obtención de brotes adventicios y/o embriones somáticos de *P. macrolepis*.

7- HIPÓTESIS

Sí la expresión de la totipotencialidad celular de los embriones cigóticos de *P. macrolepis* depende del estado de maduración y de la concentración de reguladores de crecimiento. Entonces sí se cultivan embriones en diferentes etapas de desarrollo en un amplio barrido de reguladores de crecimiento se obtendrá la formación de brotes adventicios o embriones somáticos.

8- MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1- Recolección de material biológico.

Se seleccionaron 3 árboles adultos de *P. macrolepis* en cada una de tres localidades en el estado de Tlaxcala, una ubicada en el municipio de Emiliano Zapata y dos en el de Terrenate (Fig. 6); cada localidad se designó con las letras A, B y C, respectivamente. Se consideraron árboles en buen estado, es decir, que alcanzaran una altura mayor de 15 m, con fuste recto, robustos, sin evidencias de deshidratación o daño alguno. Cabe mencionar que para la recolección se utilizó equipo especial que consistió en espuelas, arnés de seguridad y garrocha de fibra de vidrio. Cada árbol de cada localidad se designó con los números 1, 2 y 3 y se recolectaron entre 5 y 6 conos de cada árbol cada 15 días durante 5 meses en 2001, 2002 y 2003; Los conos recolectados se llevaron al laboratorio (CICB-UAT) en donde se extrajeron las semillas. Cabe mencionar que únicamente se usaron semillas que tuvieron el megagametofito en estado sólido. Debido a la falta de conos y semillas la metodología para la recolección de material biológico se modificó conforme fue necesario.

Por otro lado, con la finalidad de dar una posible explicación a la ausencia de conos, (principalmente en 2002), se analizaron los registros de heladas por mes (apéndice 3) y se realizaron diagramas ecológico-climáticas siguiendo el procedimiento indicado por Walter (1979), en donde fue posible dilucidar las condiciones favorables o de estrés para la producción de semillas y otros procesos fisiológicos vegetales (apéndice 4).

8.2- Desinfección de las semillas y cultivo de embriones cigóticos.

Cabe señalar que el método de desinfección aplicado fue diseñado con base en trabajos anteriores con semillas de *P. macrolepis* (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001). Las semillas fueron expuestas a peróxido de hidrógeno en una concentración de 10 % (v/v) en agitación durante 1h, seguido por un lavado con una Solución antibiótica antimicótica (100x) Sigma® en una concentración de 10 ml/l por 1h, después se usó cloro comercial a 10 % (v/v) para agitar las semillas por 50 min, por último se usó peróxido de hidrógeno a 1 % (v/v) en el que las semillas fueron dejadas en refrigeración por 24h; entre cada etapa de desinfección las semillas fueron enjuagadas

con agua destilada estéril. Cabe mencionar que las concentraciones y tiempos de agitación fueron aumentando con la madurez de la semilla ya que la testa de la semilla se hizo más dura, las brácteas se fueron abriendo cada vez más exponiéndolas al medio y haciéndolas más susceptibles a contaminación. Después del proceso de escarificación y descontaminación, en condiciones asépticas se procedió a la eliminación de la testa. Los megagametofitos y los embriones fueron puestos en una Solución antibiótica antimicótica (100x) Sigma® en una concentración de 5 ml/l hasta ser cultivados (aprox. 1h).

Para su cultivo, tanto megagametofitos intactos como megagametofitos cortados por la mitad (con la superficie interior en contacto con el medio), y embriones, fueron colocados horizontalmente sobre los medios nutritivos: Schenk y Hildebrandt (SH) y Murashige y Skoog (MS); adicionados con RCV (Tabla 5). Se cultivaron 10 embriones y 10 megagametofitos en cada caja petri para facilitar su observación y documentación fotográfica.

8.3- Medios de cultivo

8.3.1 Inducción.

El medio SH fue solidificado con Phytigel® (6 g/l) o con Gelrite® (3 g/l) y el medio MS con agar bacteriológico (6, 7 y 8 g/l) (apéndice 2); a ambos se adicionó 30g/l de sacarosa, 0.5 mg/l de Agente Antivitrificante® y diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento Kinetina (K) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) haciendo un total de 20 tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones (mg/l) de la combinación 2,4-D/K probadas para el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de *P. macrolepis*.

2,4-D / K mg/l	0	0.5	1	2	3
0	¹ 0/0	⁵ 0.5/0	⁹ 1/0	¹³ 2/0	¹⁷ 3/0
0.5	² 0/0.5	⁶ 0.5/0.5	¹⁰ 1/0.5	¹⁴ 2/0.5	¹⁸ 3/0.5
1	³ 0/1	⁷ 0.5/1	¹¹ 1/1	¹⁵ 2/1	¹⁹ 3/1
2	⁴ 0/2	⁸ 0.5/2	¹² 1/2	¹⁶ 2/2	²⁰ 3/2

En los diferentes medios de cultivo el pH se ajustó entre 5.7 y 5.8 antes de esterilizar a 15 lb/in² durante 15 min. El tiempo de inducción de embriones somáticos tuvo una duración inicial de 6 semanas.

8.3.2 Mantenimiento de callos.

Al término de 6 o 8 semanas de cultivo en medios de inducción los embriones cigóticos que presentaron alguna respuesta fueron subcultivados en el medio SH y MS respectivamente, libres de RCV; en intervalos de 20 o 30 días.

Para subcultivos posteriores (más de 8 o 10 semanas de cultivo a partir de la fecha inicial) se utilizó el medio B5 modificado por Litz adicionado con 60 g/l sacarosa (apéndice 2). Así mismo, con la finalidad de evitar o retardar el proceso de oxidación presentada en los callos de utilizaron diferentes condiciones de cultivo que consistieron en la adición al medio de ácido cítrico y ascórbico, carbón activado, RCV, PVP y diferentes agentes solidificantes (Tabla 6); también, algunos callos fueron colocados en matraces Erlenmeyer (de 125 ml) con 50 ml de medio de cultivo líquido, en agitación a 100 rpm.

Tabla 6. Diferentes condiciones de cultivo para disminuir la oxidación de callos de *P. macrolepis*.

Medio SH	Agente gelificante	PVP	Ácido cítrico y ascórbico	Carbón activado	RCV
A	P	0.250	X	X	-
B	P	0.250	-	-	-
C	G	0.250	-	-	-
D	G	0.250	-	-	100%
E	G	0.250	-	-	50%
F	G	0.300	-	-	-
G	-	0.300	-	-	-
H	-	0.250	-	-	-
I	-	0.250	X	-	-

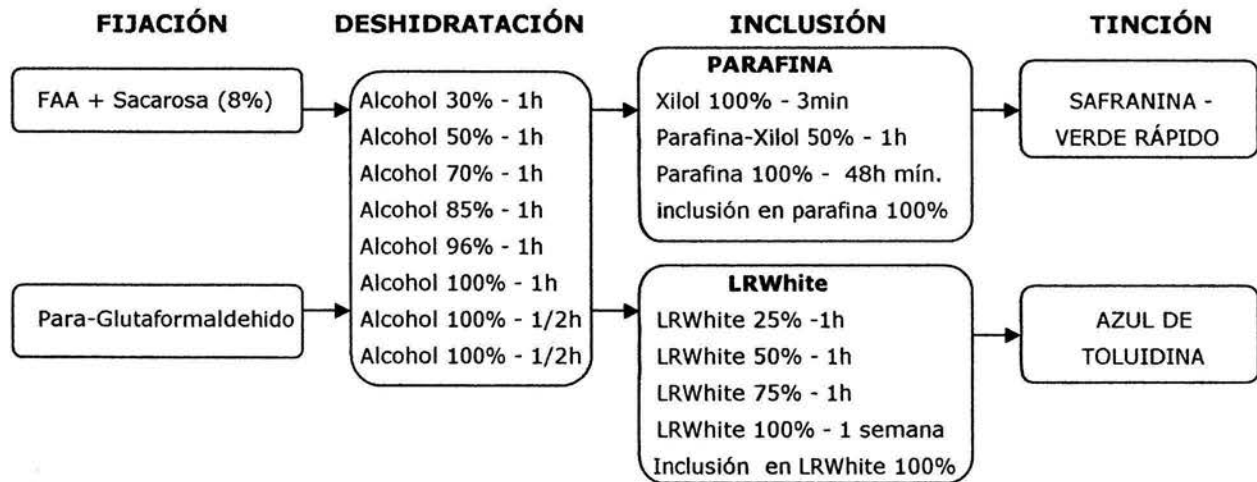
Nota. P: phytigel 5 g/l; G: gelrite 3 g/l; PVP: polivinilpirrolidona; Ácido cítrico 0.300 g/l y ácido ascórbico 0.250 mg/l; Carbón activado 1 g/l; RCV: al 100 % (a la misma concentración utilizada al principio de la inducción) y 50 % (a la mitad de la concentración inicial de reguladores de crecimiento).

Es importante señalar que los cultivos fueron incubados en oscuridad a 22°C durante todo el proceso. Se realizaron observaciones y reportes fotográficos periódicos.

8.4 Análisis histológico.

Se seleccionaron callos que presentaron una respuesta similar a lo reportado para embiogénesis somática en coníferas para estudiar los cambios estructurales que presentaron. Se utilizaron dos técnicas de fijación e inclusión, que fueron FAA-Parafina y Para-Glutaformaldehído-LRWhite (Fig. 10) (López-Curto *et al.*, 1998; Ruzin, 1999). Los explantes incluidos en parafina fueron cortados con un microtomo manual con un grosor de 8 micras y los incluidos en LR-White fueron cortados con un ultramicrotomo con un grosor entre 1 y 2 micras.

Figura 10. Técnicas histológicas utilizadas para fijar callos de *P. macrolepis* obtenidos a partir del cultivo de embriones cigóticos.



9- RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1- Resultados recolección de material biológico.

9.1.1 Recolección.

Se realizaron 17 recolectas de semilla de *P. macrolepis* (Fig. 11 A, B, C y D) entre mayo y octubre de 2001 al 2003 (Tabla 7); cabe señalar que al principio se consideró realizar dos recolectas por mes, a partir de junio y hasta septiembre de cada año, ya que según Allen y Owens (1972) el desarrollo de embriones de *P. menziesii* se lleva a cabo durante estos meses. Sin embargo, las recolectas se realizaron de acuerdo a la disponibilidad de material biológico, equipo y transporte.

Tabla 7. Fechas de recolección de conos de *P. macrolepis* realizadas en diferentes localidades del estado de Tlaxcala, Méx., en 2001, 2002 y 2003.

MES	AÑO		
	2001	2002	2003
MAYO			17
JUNIO			6 29
JULIO	21	23 28	13
AGOSTO	9 24	4 18	20
SEPTIEMBRE	7 14	30	
OCTUBRE	5	5	

Durante las recolectas se encontraron semillas con embriones en diferentes estados de desarrollo, además de renuevos, y yemas de conos y brotes de acuerdo a lo reportado por Allen y Owens (1972) para *P. menziesii* (Fig. 12); no obstante, se observó entre medio y un mes de retraso en el ciclo de *P. macrolepis* en comparación a lo reportado para *P. menziesii* en el norte de Estados Unidos.

A lo largo de las disecciones se realizaron diversas observaciones con respecto a la estructura de las semillas; a continuación se describen detalladamente. Para facilitar la descripción se separó en: conos, testas, megagametofitos y embriones.

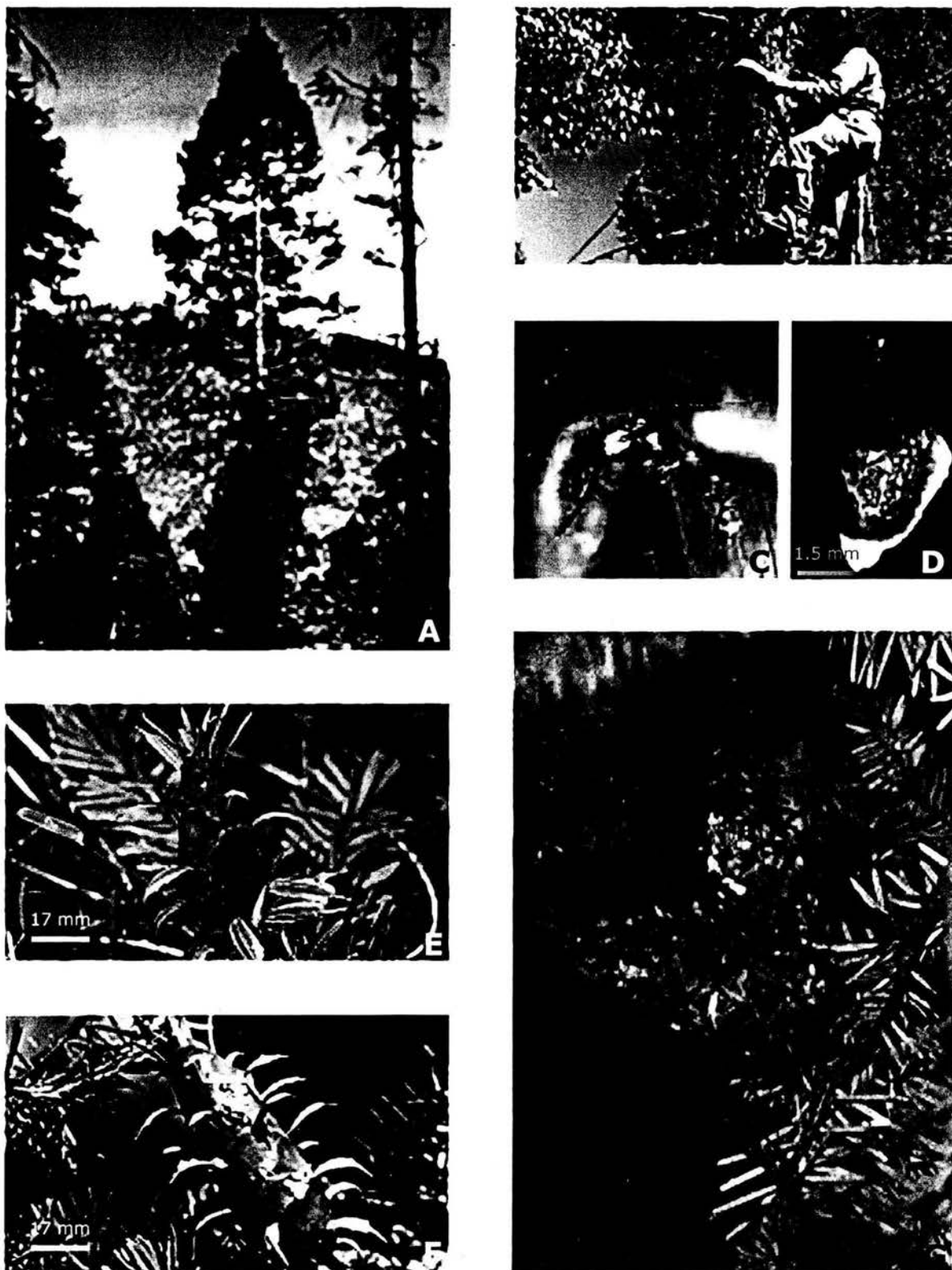
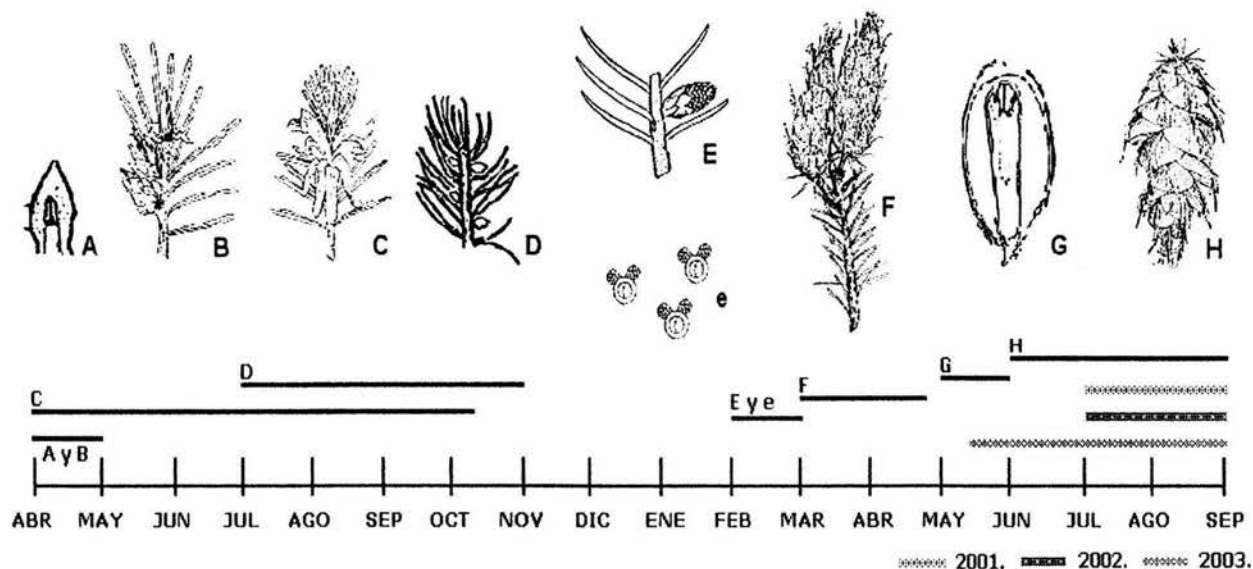


Figura 11- Recolección de material biológico y estados de maduración de conos de *P. macrolepis*. (A) Vista general de un bosque de *P. macrolepis* en el estado de Tlaxcala, México. (B) Recolección de conos de *P. macrolepis*, utilizando equipo especial que consiste en garrocha de fibra de vidrio, espuelas y arnés de seguridad. (C) Obtención de semillas de *P. macrolepis* en laboratorio (CICB-UAT). (D) Semilla de *P. macrolepis*. (E) Cono de *P. macrolepis* muy inmaduro. (F) Cono de *P. macrolepis* inmaduro. (G) Cono de *P. macrolepis* maduro.

Figura 12. Relación entre las fases del ciclo reproductivo de *P. macrolepis* con los periodos de recolectas realizadas entre 2001 y 2003.



Nota: (A y B) Iniciación y crecimiento de la yema lateral; rompimiento de la yema vegetativa; (C) Elongación del renuevo y alargamiento del primordio de la yema lateral; (D) El primordio determinado; iniciación de hojas, brácteas y microsporofilo; (E y e) Meiosis y desarrollo del polen; entre (E y F) Rompimiento de las yemas de los conos polinización, germinación del polen y fertilización; (F) Alargamiento de conos; (G) Desarrollo de embriones y semillas; (H) Conos maduros y abiertos, desprendimiento de semilla.

Conos.

Los conos recolectados, al igual que lo reportado en la literatura (Martínez, 1953; Acosta-Pérez, 1992; Mápula *et al.*, 1996), fueron largamente ovoides, encontrando conos desde 3.5 hasta 8 cm de largo por 2 a 3 cm de diámetro, generalmente con 25 a 30 brácteas. Se observó que el color varió según el estado de desarrollo, siendo morado en sus etapas muy inmaduras (Fig. 11 E), pasando por varios tonos de verde E (Fig. 11 F), hasta adquirir una coloración café-rojiza oscura en sus etapas maduras (Fig. 11 G).

Se encontraron dos semillas en cada bráctea, además se observó que las semillas ubicadas en las partes superior e inferior de los conos no se desarrollaron. El número de semillas por cono fue muy variable encontrando entre 21 y 40 y en algunos casos hasta 50 semillas en cada cono, sin embargo en promedio se encontraron 26 semillas (Tabla 8).

Tabla 8. Total de conos recolectados, semillas desarrolladas y vanas por cono de *P. macrolepis*.

Año	Conos recolectados	Número de semillas	Número de semillas vanas
2001	136	3757 x̄ 27.6 semillas por cono	2206 (58.71 %)
2002	399	8830 x̄ 22.1 semillas por cono	4835 (54.75 %)
2003	160	5938 x̄ 37 semillas por cono	1289 (21.7 %)
TOTAL	695	18,525 x̄ 26.6 semillas por cono	8330 (44.96 %)

En la tabla 8 se observa que el mayor número de conos recolectados fue en 2002, no obstante, en este año se encuentra el menor número de semillas por cono, lo que indica un bajo índice de reproducción. También, es posible observar que durante 2003 se recolectó un menor número de conos y la cantidad de semillas por cono fue mayor; al mismo tiempo, se encontró una cantidad reducida de semillas vana.

Testa

Se observó que en etapas inmaduras (primera recolección 2003) ésta es de coloración verde y se encuentra fuertemente adherida a la bráctea; es suave por lo que es posible retirar fácilmente el megagametofito y por tal motivo no requiere un proceso agresivo de escarificación. También tiene un grosor considerable (0.5-0.8 mm); se desinfecta fácilmente debido a que las brácteas están más pegadas al eje del cono y no permiten que entren patógenos.

Con la madurez la coloración de la testa cambia rápidamente de verde a amarillo claro (casi hialino), amarillo más intenso hasta café, al mismo tiempo, la consistencia de ésta se hace más dura, por lo que son necesarios procesos de escarificación más agresivos.

Megagametofitos.

En general se observó que al eliminar la testa, el megagametofito tenía una longitud de 4 mm aprox., una coloración blanquecina-amarillenta, una consistencia compacta, textura lisa, apariencia húmeda y el canal del embrión bien definido; cabe mencionar que el megagametofito no varió mucho de tamaño entre los primeros estados de desarrollo recolectados y los posteriores (Fig. 13 C). Es importante señalar que durante las primeras colectas realizadas durante 2002 se encontraron megagametofitos hialinos cubiertos por restos de la nucela que al ser cortados por la mitad tenían una consistencia suave y no se observó el canal del embrión, ni el embrión (Fig. 13 B).

La recolección de los megagametofitos más inmaduros se realizó en mayo de 2003 en la localidad de San Juan Terrenate, observando megagametofitos hialinos de consistencia suave pero firme, recubiertos por la nucela (húmeda, hialina que al deshidratarse adquiría una coloración blanquecina opaca) y en donde era posible reconocer fácilmente los arquegonios (Fig. 13 A).

Embriones.

Se recolectaron embriones en diferentes etapas de desarrollo encontrando las etapas más inmaduras a mediados de junio y principios de julio y las maduras entre septiembre y noviembre. Para facilitar la descripción del estado de madurez en el que se encontraron los embriones recolectados en las diferentes localidades se realizó una clasificación de éstos, agrupándolos en: I) embriones en etapa precotiledonaria y II) embriones en etapa cotiledonaria. Se consideró la fecha de recolección simplemente para tener una visión general de cuando pueden ser encontrados estos estados de desarrollo, no obstante, no es conveniente relacionar la fecha de recolección con el estado de desarrollo de los embriones, ya que el estado de desarrollo del embrión varía dependiendo del clima, localización del árbol donador, la posición del cono en el árbol y de la semilla en el cono (Nagmani *et al.*, 1995).

I) Embriones en etapa precotiledonaria.

Se agruparon en éste estado embriones con una longitud de 1.5 mm a 3.8 mm, incluyendo la longitud del cuerpo del embrión más la de su suspensor. Los embriones más inmaduros de este grupo eran completamente hialinos, el cuerpo del embrión era

cilíndrico, alargado, de apariencia húmeda, consistencia compacta y los más pequeños de todo el muestreo (Fig. 13 D). En etapas más avanzadas el cuerpo del embrión era más grueso y en algunos casos tenía forma globular, en donde no se distinguían cotiledones ni hipocótilo, con longitudes de 0.4 y 0.7 mm y hialino (Fig. 13 E); en algunas ocasiones en la porción superior del cuerpo del embrión se presentó una coloración blanquecina, textura lisa, consistencia compacta y apariencia húmeda (Fig. 13 F); en general presentaron un suspensor hialino largo (1.9 – 3.1 mm) en relación con el tamaño del cuerpo del embrión. Esta etapa se observó entre junio y agosto.

Otra observación importante fue que en algunas semillas recolectadas principalmente de la localidad Rancho San Juan Terrenate (2) se presentaron dos embriones (poliembriogénesis simple) (Fig. 13 K); ambos embriones se encontraron en etapa precotiledonaria, sin embargo, uno siempre fue más grande que el otro.

II) Embriones en etapa cotiledonaria.

Inmaduros:

En este grupo se incluyeron, todos los embriones en los que se comenzaron a definir los cotiledones, que presentaron una coloración blanquecina-amarillenta, su longitud variando entre 3 y 4 mm, el cuerpo del embrión tenía longitudes desde 1.2 hasta 2.5 mm, con suspensores hialinos más enrollados que los de los embriones muy inmaduros. En los embriones más inmaduros de este grupo se observaron pequeñas protuberancias en la parte superior del cuerpo del embrión semejando una corona o anillo (Fig. 13 G y H), dichas protuberancias se fueron alargando hasta dar lugar a los cotiledones. Los embriones de este grupo fueron recolectados entre finales de agosto y principios de octubre.

Maduros:

Estos embriones presentaron un color blanco amarillento, con una longitud de 3.6 a 3.8 mm (sin considerar el suspensor) y un suspensor muy enrollado (2-3 mm aprox. de longitud). La parte de los cotiledones era ligeramente más ancha que la radícula, con textura lisa, consistencia compacta y apariencia húmeda (Fig. 13 I y J). Generalmente se presentaron de 6 a 7 cotiledones bien definidos cerrados. Esta etapa se observó en las semillas recolectadas entre finales de septiembre y noviembre.

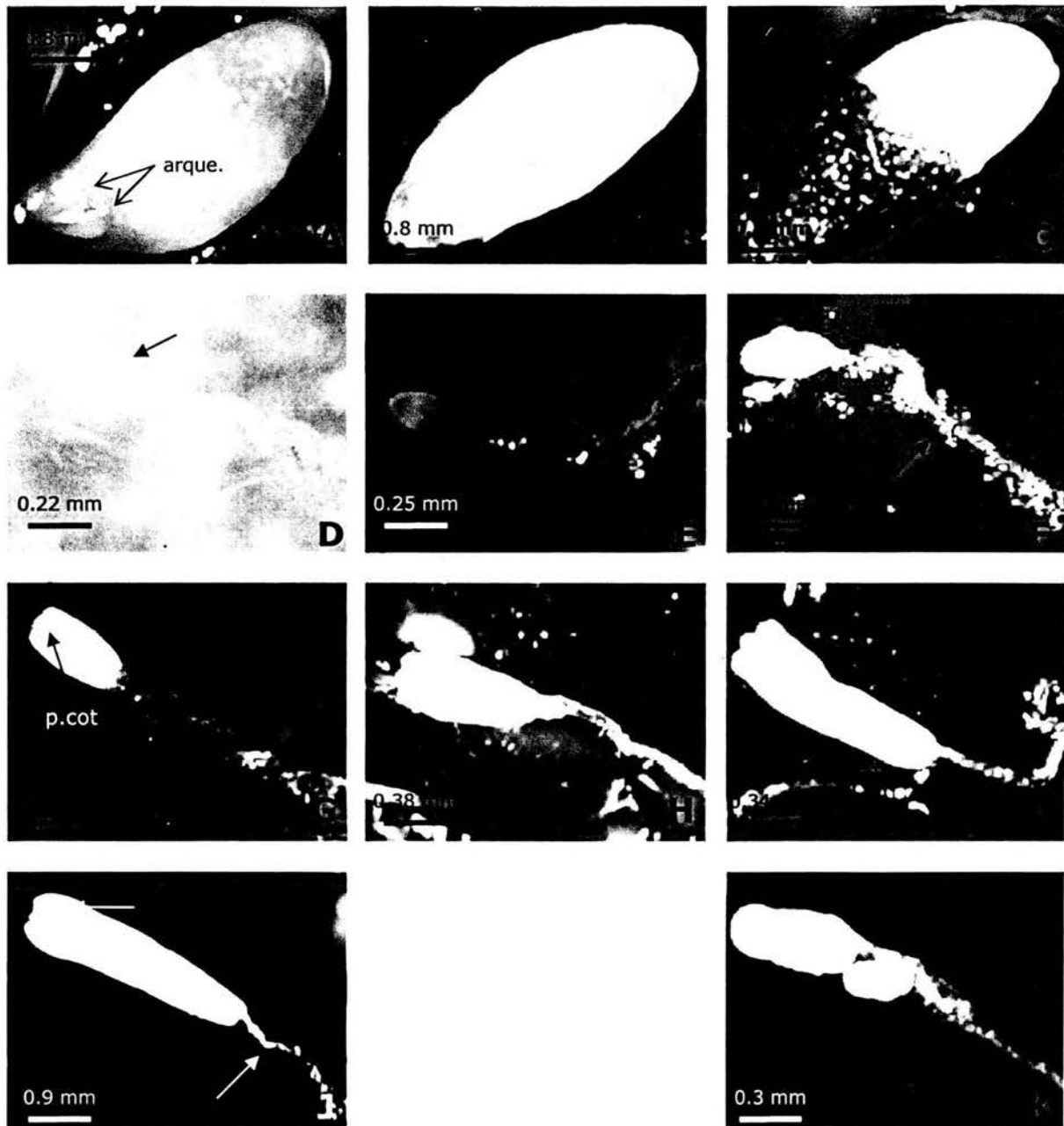


Figura 13- Estado de desarrollo de megagametofitos y embriones de *P. macrolepis*. (A) Megagametofito inmaduro con arquegonios (arque.) (estado más inmaduro de recolección). (B) Megagametofito inmaduro, hialino, suave. (C) Megagametofito maduro. (D) Embrión inmaduro, hialino, nótese la forma cilíndrica del cuerpo del embrión (etapa precotiledonaria). (E) Embrión inmaduro, hialino (etapa precotiledonaria). (F) Embrión inmaduro, coloración blanquecina en la parte superior, nótese la longitud del suspensor (etapa precotiledonaria). (G) Embrión inmaduro, con coloración blanquecina en la parte superior e hipocótilo hialino, nótese la aparición de las protuberancias que darán lugar a los cotiledones (p.cot.) (etapa cotiledonaria). (H e I) Embriónes en etapa cotiledonaria en diferentes grados de maduración, con hipocótilo blanquecino, y cotiledones en desarrollo. (J) Embrión maduro de *P. macrolepis*, nótese que el suspensor se observa más corto que en etapas precotiledonarias debido a que se enrolla sobre sí mismo y que los cotiledones (cot.) se encuentran bien desarrollados y cerrados. (K) Poliembriónía simple en *P. macrolepis*.

9.1.2 Localidades.

Se recolectó en tres localidades, una ubicada en el municipio de Emiliano Zapata y dos en el de Terrenate en el estado de Tlaxcala (Fig. 14). Se eligieron estas localidades debido a que son las menos perturbadas en el estado de Tlaxcala en donde se distribuye *P. macrolepis*, y en donde se obtuvo el permiso de los propietarios, además son de fácil acceso lo que hizo más sencillo realizar las recolectas. La elección de estas localidades se realizó en julio de 2001, seleccionando árboles en buen estado y que presentaran una cantidad considerable de conos, sin tomar en cuenta la producción de conos de los años subsiguientes de recolección; ésto último con la finalidad de tener suficientes conos para recolectar sin retirar todos del árbol.

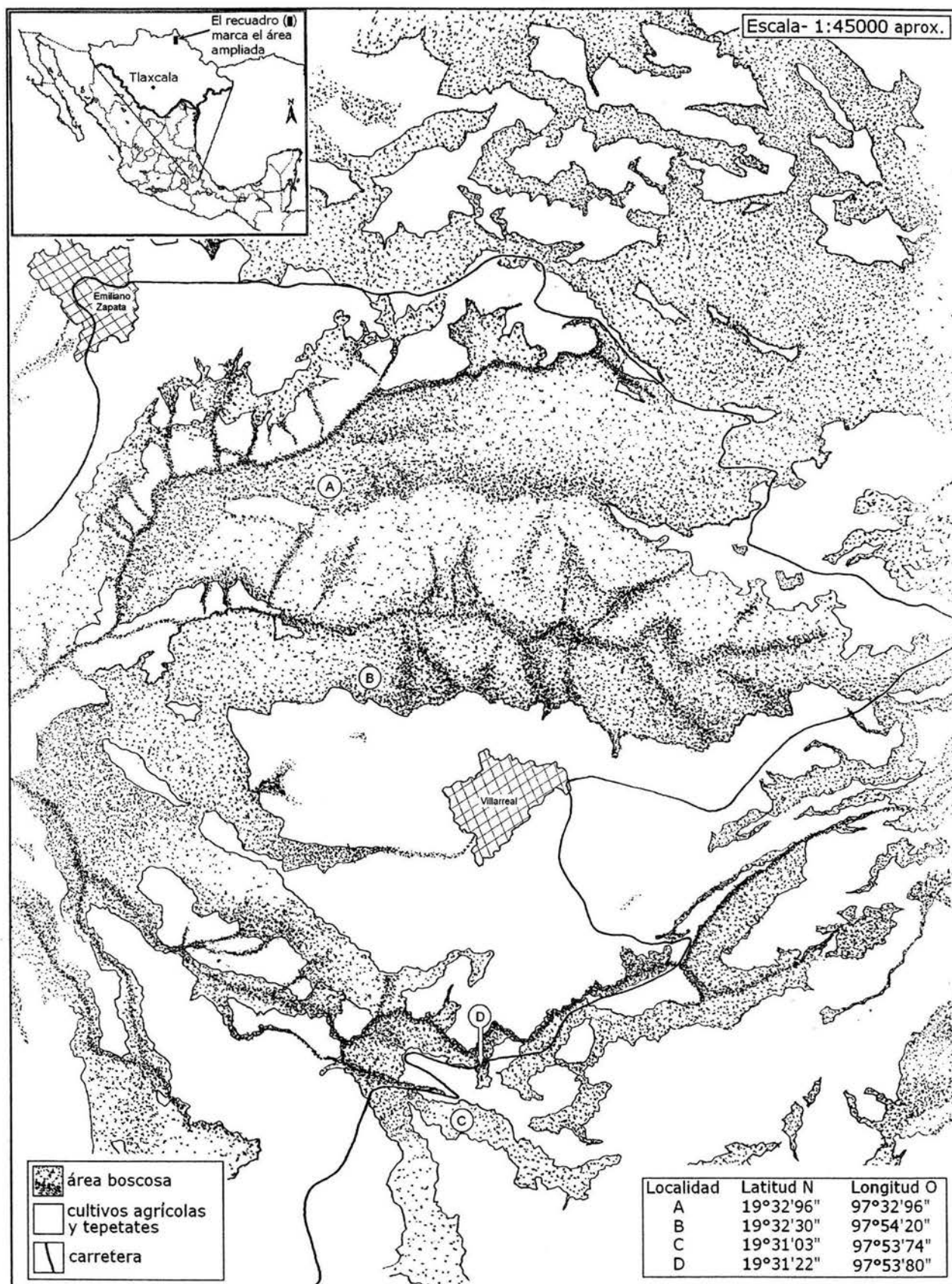
Debido a la ausencia de conos en 2002 y 2003 en las localidades designadas en 2001, surgió la necesidad de recolectar en donde hubiera árboles de *P. macrolepis* con conos en aparente buen estado, afortunadamente estos se encontraron en una localidad cercana a San Juan Terrenate (1); esta localidad fue designada como San Juan Terrenate (2). De esta forma, en total se recolectó en 4 localidades (Fig. 14); todas se encontraron en laderas con exposición norte, en donde *Pseudotsuga* se relaciona principalmente con *Abies*.

A) Emiliano Zapata (vivero ejidal).

Esta localidad se encuentra a 3 Km de la población de Emiliano Zapata ubicada a 2900 msnm. Es un área ejidal en donde las personas de la localidad pretendieron establecer un vivero de *P. macrolepis* sin tener éxito.; los árboles en esta localidad miden aproximadamente 30 ($\pm$ 10) m de alto y 60 cm de diámetro (diámetro a la altura del pecho); ésta es una de las localidades menos perturbadas y en donde se encontró regeneración natural de *Pseudotsuga* y *Abies*. En esta localidad se realizaron un total de 6 recolectas, 4 durante 2001 y 2 en el 2002.

B) Villarreal.

Esta localidad se ubica a 500 metros de la población de Villarreal en el municipio de Terrenate, Tlax., a 3080 msnm; en donde es posible encontrar árboles de *P. macrolepis* entre 15 y 30 metros de altura. Solo se realizó una recolección en septiembre de 2001. Cabe mencionar que debido a que ésta localidad se encuentra muy cercana a la población es frecuentemente utilizada para pastoreo y en algunas zonas como basurero por lo que está muy perturbada.

Figura 14. Ubicación de áreas de recolecta de conos de *Pseudotsuga macrolepis* en el estado de Tlaxcala.

C) Rancho San Juan Terrenate (1)

Localidad ubicada a 3000 msnm, en el camino entre Terrenate y Villarreal, Tlax., colindando con el estado de Puebla. Es una localidad pequeña, con árboles de *P. macrolepis* de no más de 20-25 metros de alto; cercana a zonas de cultivo (1-3 metros) principalmente de papa, avena y haba. En ésta, sólo se realizaron 3 recolectas en 2001.

D) Rancho San Juan Terrenate (2)

En esta localidad se realizaron 9 recolectas (4 en 2002 y 5 en 2003) a partir de 6 árboles. Se recolectaron un total de 322 conos de los cuales se obtuvieron 13,855 semillas, lo cual representa el 46% y el 75 % respectivamente, del total de conos y semillas recolectados a lo largo de esta investigación (Tabla 9). El 81.6 % del total de embriones y megagametofitos cultivados en este trabajo pertenecieron a esta localidad (Tabla 9) observando con esto que a pesar de que es una de las poblaciones más pequeñas y expuesta a factores externos como tala, ataque por plagas e incendios, es posible que sus condiciones internas se encuentren en buenas condiciones, al menos las de la mayoría de los árboles muestreados.

Tabla 9. Valores totales de recolectas de la localidad San Juan Terrenate (2) respecto al porcentaje total de las recolectas realizadas.

	Recolección	Num. Árboles	Conos recolectados	No. de semillas	Semillas vanas	Embriones cultivados
TOTAL Localidad D	9 RECOLECTAS	6 ÁRBOLES	322 CONOS	13855 43 sem. cono	5537 40 %	8318 60 %
% respecto al total de recolectas	52 %	40 %	46%	75%	66.5%	81.6 %

9.1.3 Años de recolección.**AÑO 2001**

Primer año de recolección para esta investigación; en este año se seleccionaron las localidades y árboles para las subsecuentes recolectas, considerando principalmente su estado físico y la disponibilidad de conos. Durante 2001 se realizaron 6 recolectas en las localidades A, B y C (Tabla 10).

En la localidad **A**, en la primera y segunda recolección se observó una gran cantidad de conos inmaduros, con embriones en etapa precotiledonaria mientras que en la tercera y cuarta se observaron conos maduros con coloración verde, con embriones inmaduros y maduros en etapa cotiledonaria; observando que los embriones se desarrollaron rápidamente en el cono.

Tabla 10. Recolectas de conos de *P. macrolepis* durante 2001.

Localidad	Fecha de recolección	Num. Árbol	Conos recolectados	No. de semillas	Semillas vanas	Embriones cultivados
A	21/07	varios	15	502	262	240
	09/08	1	5	175	85	90
	09/08	2	5	193	128	65
	09/08	varios	7	241	181	60
	24/08	varios	12	351	247	104
	14/09	varios	7	223	138	85
Total			51	1685 $\bar{x}$ 33	1041 61.8 %	644 38.2 %
B	07/09	1	14	295	290	5
	07/09	2	10	170	157	13
	07/09	3	11	182	142	40
Total			35	647 $\bar{x}$ 18.4	589 91 %	58 9 %
C	09/08	1	6	95	75	20
	07/09	varios	8	291	101	190
	05/10	2	20	495	245	250
	05/10	3	16	544	155	389
Total			50	1425 $\bar{x}$ 28.5	576 40.4 %	849 59.6 %

Localidades: A) Emiliano Zapata; B) Villarreal; C) San Juan Terrenate (1)

Por otra parte en la localidad **B**, en septiembre se recolectaron 35 conos, de los cuales se obtuvieron 647 semillas, en promedio 18 semillas por cono (Tabla 10), siendo este valor bajo en comparación al total de semillas por cono recolectados en este trabajo que fue de 26.65 (Tabla 8); además, del total de semillas solo el 9% tenían embrión y el 91% fueron

semillas vanas y plagadas (Tabla 10). Por esta razón no se realizaron recolectas consecutivas en este año. Cabe mencionar que en 2002 se presentaron pocos conos y todos dañados (Fig. 15 A y E) (principalmente por insectos y aves), todos fueron recolectados pero no fue posible obtener semillas por lo cual esta localidad no se consideró para recolectas consecutivas.

Así mismo, en la mayoría de las semillas recolectadas en esta localidad se observó un orificio en la testa, en la parte que se encuentra en contacto con la escama del cono; es muy probable que este daño haya sido originado por *Megastigmus* sp. (Fig. 15 B) ya que al emerger en primavera el adulto hace un pequeño orificio en la semilla para poder salir (Coulson y Witter, 1998; www.forestry.ubc.ca). Además, en algunos conos recolectados se presentaron larvas blanquecinas probablemente pertenecientes a individuos de los géneros *Diorictria* o *Barbara* sp. (Fig. 15 C) (www.forestry.ubc.ca).

En la localidad **C** se realizaron 3 recolectas (Tabla 10); encontrando embriones inmaduros y maduros en etapa cotiledonaria. En contraste de lo observado en años consecutivos, en 2001 se obtuvieron 1425 semillas; el 59.6 % tuvo embriones que fueron cultivados y sólo el 40.4 % de las semillas fueron vanas.

AÑO 2002

En este año las revisiones a las localidades se comenzaron a partir de mayo, no obstante, hasta el mes de julio se encontraron algunos conos en la localidad **A** por esta razón, en agosto de este año se seleccionó una localidad más, en donde se observaron árboles con una gran cantidad de conos y se denominó "localidad **D**". De esta forma, se realizaron 6 recolectas; 2 en la localidad **A** y 4 en la **D** (tabla 11).

En la localidad **A**, se encontraron algunos conos en los árboles marcados, los cuales se recolectaron y se llevaron a laboratorio (CICB-UAT). Con base en las revisiones se observó que el 88 % de ellos se encontraban plagados (con larvas del género *Barbara* sp. (www.forestry.ubc.ca) (Fig. 15 C)). Al disectar las semillas, se encontraron embriones tanto en etapa precotiledonaria como en la cotiledonaria, en contraste a la recolección realizada un año antes en la que en las mismas fechas los embriones se encontraban únicamente en etapa precotiledonaria. Se realizaron revisiones posteriores en estos árboles, pero no se encontraron conos.

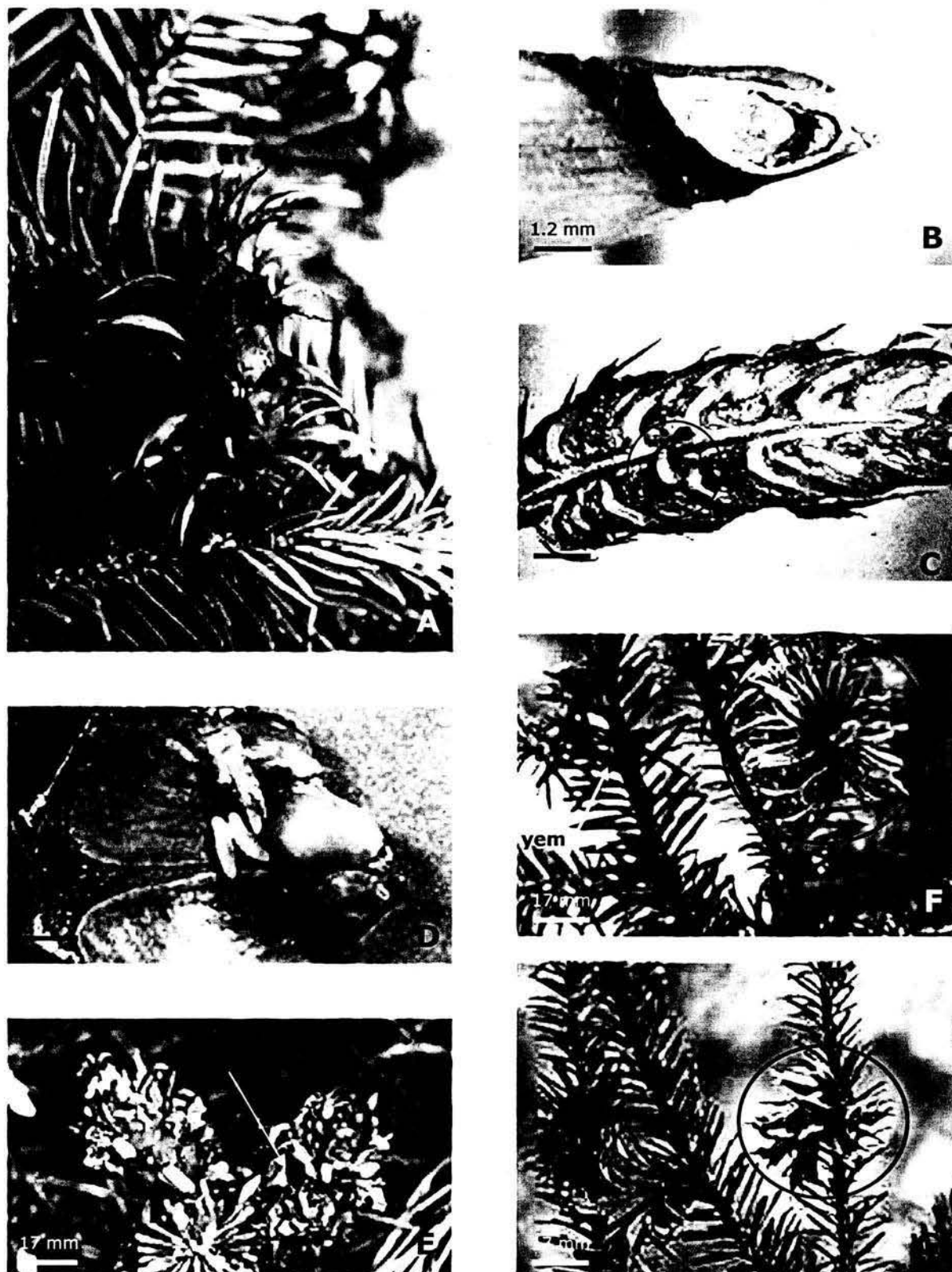


Figura 15- Daños en conos de *P. macrolepis*. (A) Cono en mal estado, ocasionado por parásitos (tamaño real). (B) Larva de *Megastigmus* sp. en una semilla de *P. macrolepis*. (C) Larva de *Barbara* sp. en un cono de de *P. macrolepis*. (D) Larvas de *Asinapta* sp. en una escama con semillas de *P. macrolepis*. (E) Conos de de *P. macrolepis* atacados por aves, nótese las brácteas abiertas por los picos de aves. (F-G) Conos y yemas (yem) de *P. macrolepis* sin desarrollar que paulatinamente se secan. Nota: B, C y D fuente: www.forestry.ubc.ca.

Se realizaron varias revisiones en los árboles seleccionados de la localidad **C**, encontrando en total 10 conos pequeños (no más de 3 cm), de color verde opaco, en algunos casos secos y en otros sin haber desarrollado (Fig. 15 F y G). Por otro lado, se observó un alto porcentaje de brotes vegetativos y de yemas alargándose (Fig. 15 F). Esta localidad no aparece en la tabla 11 debido a que no se obtuvieron semillas de los conos recolectados por su mal estado.

Tabla 11. Recolectas de conos de *P. macrolepis* durante 2002.

Localidad	Fecha de recolección	Núm. Árbol	Conos recolectados	No. de semillas	Semillas vanas	Embriones cultivados
A	23/07	1	8	125	64	61
	23/07	2	9	173	64	109
	28/07	3	28	615	459	156
Total			45	913 x̄ 20	587 64.3 %	326 35.7 %
D	04/08	1	192 *	4280	1590	2690
	04/08	2	15	236	134	102
	18/08	1	19	351	143	208
	18/08	2	35	692	412	280
	30/09	1	18	319	119	200
	30/09	3	15	370	370 (100%)	-
	05/10	3	17	537	536 (99.8%)	1
	05/10	4	25	487	484 (99.4%)	3
	05/10	5	18	645	460 (71.4%)	185
Total			354	7917 x̄ 22.3	4248 53.7 %	3669 46.3 %

Localidades: A) Emiliano Zapata; D) San Juan Terrenate (2)

En la localidad **D**, la primera recolección se realizó en un árbol que se encontraba liberando sus conos (árbol **1**), probablemente influenciado por algún cambio fisiológico o meteorológico, encontrando en el suelo que lo circundaba 192 conos inmaduros en buen estado sin ninguna evidencia de deshidratación o ataque por insectos. De estos conos se logró obtener 2690 embriones (que fueron cultivados), la gran mayoría en etapa

precotiledonaria. En la siguiente recolección en este mismo árbol se encontraron algunos embriones en etapa precotiledonaria, no obstante, la mayoría fueron embriones inmaduros en etapa cotiledonaria; confirmando que los embriones se desarrollan rápidamente cuando aun se encuentran en el cono; en las subsiguientes recolectas se encontraron embriones inmaduros y maduros en etapa cotiledonaria.

Por otro lado, se observó que a pesar de que los árboles **3**, **4** y **5** tuvieron una cantidad considerable de conos, (se recolectaron en total 75), éstos tuvieron entre el 71 y el 100 % de semillas vanas (Tabla 11); aunado a esto, estos 3 árboles se encontraron plagados con larvas, probablemente del género *Asynapta* sp. (Fig. 15 D) (www.forestry.ubc.ca); larvas muy pequeñas (1 mm aprox.), de color amarillo que se encontraban en las escamas de los conos entre las alas de las semillas, cercanas al eje del cono, que se alimentan de la resina del cono matándolo y por consiguiente a las semillas. Además, en toda la localidad se encontraron conos tirados atacados por roedores y aves (Fig. 15 E).

AÑO 2003

Todos los conos de 5 recolectas realizadas durante este año provienen de la localidad **D** (Tabla 11); la primera recolección realizada fue a mediados del mes de mayo y a diferencia de 2002 se encontraron conos en estado muy inmaduro. Cabe señalar que se realizaron revisiones en las localidades **A** y **C**; sin embargo, no se encontraron conos en ninguno de ellos. Además, en esta última zona de recolección se observó una gran cantidad de brotes laterales en desarrollo (al igual que lo observado en 2002) (Fig. 15 G) y una cantidad considerable de yemas; sin embargo, a pesar de que lo mismo fue observado en 2002 las yemas que eran susceptibles a formar conos conillos o primordios no presentaron ningún cambio.

En la localidad **D**, en este año se observó una gran cantidad de conos en el árbol **1**, no obstante, no fue tan prolífico como en 2002. Con esto es posible afirmar que la producción de conos no es la misma cada año, sin embargo, cada año hay producción de semilla. En la primera recolección (17 de mayo), se encontraron megagametofitos muy inmaduros y no se observaron los embriones. A finales de junio (recolección de 29 de junio) se recolectaron los primeros embriones muy inmaduros en etapa precotiledonaria. En la siguiente recolección (13 de julio) se encontraron embriones aun en etapa precotiledonaria y en la última recolección (20 de agosto) la mayoría fueron embriones inmaduros en etapa cotiledonaria. Cabe señalar que debido al tiempo

dispuesto para este trabajo de investigación no se realizaron más recolectas durante este año.

Por otro lado, durante 2003, en la primera recolección, se encontraron cantidades bajas de semillas vanas, especialmente en el árbol **6** de la localidad **D**; árbol joven, vigoroso, de aprox. 6 m de alto, en donde sólo hubo 10 semillas vanas de 570 recolectadas lo que representa tan solo el 1.75 % de semillas vanas, además, los conos no presentaron ningún tipo de plaga (Tabla 12). Así mismo en los árboles **1** y **2** en la segunda recolección se encontró el 8.3 y el 5.6 % (respectivamente) de semillas vanas (datos no mostrados). Lo cual representa una cantidad mínima en comparación con el árbol **3** que tuvo el 94 % de semillas vanas recolectadas en 20 de agosto. Cabe mencionar que durante la disección de las semillas se encontraron larvas de *Megastigmus* sp. (Fig. 15 B) que aunque en un bajo porcentaje (1% aprox.) podría representar un gran problema si esta plaga se disemina.

Tabla 12. Recolectas de conos de *P. macrolepis* durante 2003.

Localidad	Fecha de recolección	Núm. Árbol	Conos recolectados	No. de semillas	Semillas vanas	Embriones cultivados
D	17/05	6	17	570	10	560 (mega)
	06/06	1	21	722	60	662 (mega)
	06/06	2	18	691	39	652 (mega)
	29/06	1	22	846	229	292 (emb) 325 (mega)
	29/06	2	17	577	65	213 (emb) 299(mega)
	29/06	3	15	592	248	344 (mega)
	13/07	1	8	322	109	213 (emb)
	13/07	2	8	344	96	243 (emb) 5 (mega)
	20/08	2	10	400	71	329 (emb)
	20/08	3	10	327	309	18 (emb)
	20/08	6	14	547	53	494 (emb)
Total			160	5938 x̄ 37.11	1289 21.7 %	4649 78.3 %

Localidades: D) San Juan Terrenate (2); mega- megagametofitos; emb- embriones.

FENÓMENOS METEOROLÓGICOS

Los datos para la realización de los diagramas ecológico-climáticas (considerando distribución de temperatura y precipitación) (apéndice 4) fueron tomados de las estaciones meteorológicas más cercanos a las localidades seleccionadas, siendo: **El Epazote** (cercana a la localidad **A**) y **Terrenate** (cercana a las localidades **B, C y D**)

En la estación meteorológica **El Epazote** no se presentaron condiciones desfavorables (apéndice 4) durante ninguna etapa del ciclo fenológico de *P. macrolepis* (Fig. 3). No obstante, es probable que independientemente de las condiciones meteorológicas y más bien refiriéndonos a las condiciones fisiológicas como edad, vigor, etc. de la especie la escasez de semillas solo se deba a que no fueron un años semilleros.

También se consideraron los registros de heladas observando que se presentaron heladas primaverales durante el año 2000 (apéndice 3); estas heladas pueden eliminar las yemas reproductivas recién formadas o dañar los frutos inmaduros (Yañez, 1991) y de esta forma tal vez se pudo afectar la producción de conos de 2001.

Terrenate, en esta estación meteorológica tampoco se presentaron condiciones de estrés, excepto en julio del 2000. Sin embargo, es muy probable que no haya afectado la producción semillera debido a que durante este periodo los conos y semillas ya se encontraban formados y estaban en la etapa de alargamiento.

9.2- Discusión de la recolección de material biológico.

El género *Pseudotsuga* en México, ha sido poco estudiado a pesar de que enfrenta una fuerte problemática de sobrevivencia, que lo ha llevado a estar bajo protección especial (DOF, 2001). Recientemente se han realizado algunos trabajos principalmente de carácter comparativo-morfológico y ecológico (Yañez, 1991; Méndez-Montiel y Zavala-Chávez, 1996; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; Guerra-De la Cruz, 2001; Reyes *et al.*, 2003; Mápula-Larreta *et al.*, 2004); Sin embargo, se carece de estudios del ciclo fenológico de este género en México y principalmente en las poblaciones más sureñas de su distribución, en donde se encuentra en pequeñas poblaciones aisladas y las condiciones climáticas son agresivas (temperaturas altas por el día y muy bajas por la noche; sequías durante invierno y primavera) en comparación a las del norte de América.

A pesar de que la finalidad de este trabajo no fue estudiar la fenología de *P. macrolepis*, con base en las recolectas realizadas durante tres años se pudieron observar algunos aspectos de su ciclo fenológico en una de las zonas más sureñas de su distribución, el estado de Tlaxcala (tabla 13).

Tabla 13. Ciclo fenológico de *Pseudotsuga*; comparación entre Norte América (Allen y Owens, 1972) y Tlaxcala, Méx. definido en los resultados de este estudio.

Ciclo fenológico de <i>Pseudotsuga</i>	Norte América	Tlaxcala, Méx.
• Iniciación y crecimiento de la yema lateral; germinación de la yema vegetativa.	abr. - may.	abr.* - jun.
• Elongación del renuevo y alargamiento del primordio de la yema lateral.	abr. - jul.	may. - ago.
• El primordio llega a ser determinado; iniciación de hojas, brácteas y microsporofilos.	jul. - nov.	ago. - nov.*
• Meiosis y desarrollo del polen.	feb. - mar	feb.* - abr.*
• Crecimiento de las yemas de los conos "floración" polinización, germinación del polen y fertilización.	abr. - jun.	abr.* - jul.*
• Alargamiento de conos.	may. - jun.	may. - jul.
• Maduración de embriones y semillas.	jul. - sep.	jul. - oct.
• Conos maduros y abiertos, desprendimiento de semilla.	sep. - oct.	oct. - dic.

*Eventos no registrados.

Allen y Owens en 1972, reportaron de manera general el ciclo fenológico del género *Pseudotsuga*; en comparación a este trabajo, en las poblaciones estudiadas en esta investigación de *P. macrolepis* se observó entre 1 y 2 meses retraso en algunas fases del ciclo, principalmente en cuanto a la maduración y liberación de la semilla.

Se observó que la maduración de las semillas de las poblaciones estudiadas de *P. macrolepis* ocurrió entre julio y octubre (Tabla 13), probablemente debido a las condiciones climáticas y geográficas en donde se encuentran. Con respecto a la maduración de semillas en las poblaciones mexicanas del género *Pseudotsuga*. Niembro (1979) mencionó que se realiza en los meses de octubre, noviembre y diciembre; mientras que Yáñez (1972 *fide* Pérez-Sánchez, 1996) estableció para el municipio de Tlaxco, Tlax. los meses de septiembre y octubre, lo cual concuerda con lo observado; mientras que para *P. menziesii* var. *menziesii* a elevaciones medias o bajas como las encontradas en Oregon, los conos maduran a mediados de agosto y a mediados de septiembre en el norte de Washington y sur de la Columbia Británica (Hermann y Lavender, 1999).

En cuanto a la liberación de la semilla se encontró que se realiza entre octubre y diciembre (Tabla 13), mientras que Allen y Owens (1972) y Hermann y Lavender (1999) reportaron que la liberación de dos terceras partes de la producción de semillas de *P. menziesii* en Oregon y Washington ocurre a entre septiembre y finales de octubre, mientras que en la Columbia Británica la mitad de la producción se libera a finales de octubre y el resto después de marzo.

Se ha observado que los factores ambientales se encuentran relacionados con la latitud, longitud y altitud de cada región (Hermann y Lavender, 1999; Rzedowski, 1978 *fide* Reyes *et al.*, 2003), y estos factores, en conjunto influyen en el ciclo fenológico de las especies distribuidas en tal región. Esto nos puede sugerir una respuesta en cuanto a las diferencias, que existen entre las poblaciones de Norte América con las del centro de México en donde se encuentran más expuestas a sequías y a altas temperaturas.

Estas diferencias son más visibles cuando se comparan caracteres morfológicos y anatómicos entre las poblaciones. En esta investigación no se registraron las diferencias anatómicas y morfológicas de los árboles y poblaciones muestreadas; sin embargo, se ha observado una gran diferencia de estos caracteres entre poblaciones y aun entre individuos de *Pseudotsuga* en localidades de la Sierra Madre Oriental y occidental y el

centro del país, atribuidas principalmente a adaptaciones fisiológicas a los ambientes particulares de cada población (Reyes *et al.*, 2003)

Por otro lado, se sabe que el carácter vano de las semillas de *Pseudotsuga* representa una de las principales problemáticas, en este trabajo se encontró que el 44.96 % del total de semillas recolectadas fueron semillas vanas; estos datos se encuentran por debajo con lo que encontraron Mápula-Larreta *et al.* (2004), Zavala-Chávez y Méndez-Montiel (1996) y Yañez (1991), quienes reportaron valores entre 55 y 62 % de semillas vanas de conos de *Pseudotsuga* en poblaciones de Hidalgo, Méx. No obstante, estos porcentajes se encuentran dentro de los intervalos de semillas vanas (44 y 58 %) que han sido reportados para poblaciones de *P. menziesii* en Norte América (Schwalter *et al.*, 1985 *fide* Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; Dombroski y Schwalter, 1988 *fide* Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

A pesar de que en un estudio de la capacidad reproductiva realizado recientemente en algunas poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* se observó que las del centro del país muestran índices de reproducción menores en comparación a las poblaciones del norte (mayor cantidad de semillas vanas y menor cantidad con embrión) (Mápula-Larreta *et al.*, 2004); parece ser que la presencia de semillas vanas en *Pseudotsuga* es un problema importante y común, pero aún no hay claridad sobre las causas que lo originan.

Algunos autores mencionan como posibles causantes a la escasez de polen, la poca variabilidad, la autopolinización y como consecuencia, el aborto. No obstante, en un estudio realizado en el Estado de Hidalgo se encontró que la falta de una diferencia significativa respecto al número de semillas vanas entre conos autopolinizados y los polinizados libremente podrían indicar que la autopolinización no ocasiona la producción de semillas vanas de esta especie, al menos en el área estudiada (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Otras posibles causas podrían ser la competencia por nutrimentos entre semillas y óvulos durante el desarrollo en el cono, o también al hecho de que la producción de semillas vacías sea un fenómeno adaptativo (Willson, 1983 *fide* Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Por otro lado, el carácter vano también se ha adjudicado a la depredación por insectos principalmente del género *Megastigmus* en el caso de *Pseudotsuga* (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; Coulson y Witter, 1998; Cibrián-Tovar *et al.*, 1995 *fide* Mápula-Larreta *et al.*, 2004).

El ataque de roedores, aves y principalmente insectos es otro problema que afecta la producción anual de semillas de *Pseudotsuga*; en un estudio realizado en el estado de Hidalgo se identificaron varias especies del complejo trips, *Contarinia* sp. y *Megastigmus spermotrophus* que atacan conillos, conos y semillas de *P. macrolepis*; siendo que los insectos del complejo trips y las larvas de *Contarinia* ocasionan el mayor daño (Méndez-Montiel y Zavala-Chávez, 1996). No obstante, estudios previos reportan que *Megastigmus*, que es una de las principales plagas que atacan *Pseudotsuga* en Norte América (Coulson y Witter, 1998; www.forestry.ubc.ca), en México podría reducir la producción de semillas hasta en un 19% (Cibrián-Tovar *et al.*, 1995 *fide* Mápula-Larreta *et al.*, 2004). Sin embargo, en trabajos realizados recientemente, incluyendo esta investigación, se ha reportado que el daño por insectos es aproximadamente del 1% (Mápula-Larreta *et al.*, 2004), aunque, el ataque por insectos debe ser monitoreado en varios ciclos para verificar estos datos y de ser necesario establecer medidas de control apropiadas para que no represente un problema grave y ponga en riesgo la permanencia de esta especie.

El clima es uno de los factores que afectan la producción de semillas, se ha reportado que aun en años semilleros si las condiciones climáticas no lo permiten la producción de semillas es baja (Pérez-Sánchez, 1996). Con respecto a esto Hutchinson y Bramlett (1964 *fide* Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996) encontraron que a bajas temperaturas es común el aborto de conos femeninos de pinos después de la polinización; así mismo, algunos autores consignan que la mortandad de conos de pinos está relacionada con un déficit de humedad (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Sin embargo, la relación más directa entre las condiciones atmosféricas y la producción de semillas se presenta en la época de formación y apertura de yemas, ya que las heladas primaverales pueden eliminar las yemas reproductivas recién formadas o dañar los frutos inmaduros; mientras que, las sequías o temperaturas demasiado altas pueden provocar el aborto de conos o una marcada reducción en el tamaño de la semilla (Yañez, 1991).

Se realizaron diagramas ecológico-climáticos siguiendo el procedimiento indicado por Walter (1979). Con éstas fue posible dilucidar las condiciones favorables o de estrés para la producción de semillas y otros procesos fisiológicos vegetales; además se analizó la presencia de heladas. Se observó que no se presentaron condiciones desfavorables para la producción de semillas en las poblaciones estudiadas durante los años de recolección (2001, 2002 y 2003); de esta forma, fue posible señalar que las condiciones climáticas no

estuvieron influyendo de manera importante en la producción de semilla durante los años de recolección.

El hecho de que no se encontraran semillas en Emiliano Zapata, Villarreal y San Juan Terrenate (1), entre 2002 y 2003, pudo resultar de un fenómeno que se presenta en árboles forestales por el agotamiento de las reservas de carbohidratos durante la producción de semilla y la necesidad de acumular reservas frescas en el año siguiente, denominado año semillero, que se presenta cada 2 a 7 años (Franco, 1990; Hermann y Lavender, 1999), aunado a condiciones desfavorables que pudieron existir en años anteriores. Es posible que para la localidad San Juan Terrenate (2), 2003 haya sido un año semillero y/o que las condiciones ambientales fueron adecuadas para una mayor producción de semillas, ya que el 75% del total de semillas recolectadas provinieron solo de esta localidad.

Se ha reportado que en general las poblaciones mexicanas tienen índices reproductivos mucho más bajos en comparación con las poblaciones de Norte América (Mápula-Larreta *et al.*, 2004) ya que se ha observado que las poblaciones de *Pseudotsuga* que se encuentran en los límites de su distribución natural están expuestas a condiciones inadecuadas de clima y suelo por lo que sus índices de reproducción son bajos.

Ya que las poblaciones estudiadas durante esta investigación están expuestas a grandes presiones de selección representan un importante recurso genético, que podría ser utilizado para las grandes poblaciones de Norte América cuando el cambio climático sea más severo (Reyes *et al.*, 2003; Mápula-Larreta *et al.*, 2004); por esta causa es necesario continuar con los estudios para establecer protocolos para su propagación conservación y manejo.

9.3- Resultados cultivo de embriones cigóticos.

Las diversas recolectas de material biológico a diferentes tiempos se realizaron con la finalidad de cultivar embriones en diferentes etapas de desarrollo y observar su respuesta *in vitro* bajo tratamientos con RCV.

En general se obtuvieron 3 tipos de respuesta: **a)** germinación; **b)** organogénesis y **c)** formación de callo blanquecino, parecido al reportado para embriogénesis somática (Tautorus *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Attree y Fowke, 1993; von Arnold *et al.*, 2002); en la tabla 5a se señalan las concentraciones de RCV y en cuales se presentaron estos tipos de respuesta.

Tabla 5a. Combinaciones y concentraciones (mg/l) de reguladores de crecimiento para la inducción de embriones somáticos de *P. macrolepis*.

2,4-D / K	0	0.5	1	2	3
0	1 0/0	5 0.5/0	9 1/0	13 2/0	17 3/0
0.5	2 0/0.5	6 0.5/0.5	10 1/0.5	14 2/0.5	18 3/0.5
1	3 0/1	7 0.5/1	11 1/1	15 2/1	19 3/1
2	4 0/2	8 0.5/2	12 1/2	16 2/2	20 3/2



= Testigo



= Tratamientos con respuesta organogénica.



= Tratamientos que formaron callo parecido al reportado para embriogénesis somática

a) Germinación.

Este tipo de respuesta fue mostrado por los embriones cultivados en el tratamiento 1 (sin RCV). Después de 5 días de cultivo los embriones en etapa cotiledonar empezaron a alargarse, principalmente la porción del hipocótilo, poco después (10-15 días) los cotiledones se separaron y comenzaron a adquirir una coloración verde-amarillenta; después de 35 días de cultivo esta coloración no cambió, a consecuencia de la falta de iluminación.

Por otro lado, el eje hipocótilo radicular se desarrolló como en cualquier planta normal, hasta presentar una raíz primaria bien definida. En total, entre el cuerpo del embrión y la raíz, los embriones alcanzaron en promedio una longitud de 1.5 a 2.5 cm (sin considerar la raíz) y no se observó la formación de primordios foliares (Fig. 16 A).

Al cabo de 50- 70 días de cultivo se oxidaron y finalmente murieron; así mismo los embriones en etapa precotiledonaria, los cuales durante los primeros 10 a 20 días de cultivo se hincharon y no presentaron ningún otro cambio; al cabo de 4 semanas de haber sido cultivados también se oxidaron. Cabe señalar que después de 35 o 40 días de cultivo, algunos embriones testigo fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 luz, sin embargo, al igual que el resto de los embriones iniciaron un proceso de oxidación y murieron.

b) Organogénesis.

Es importante señalar que los embriones recolectados durante 2001 y 2002 fueron cultivados únicamente en el medio nutritivo SH (adicionado con RCV). En 2001 se utilizaron los 20 tratamientos de RCV mencionados en la tabla 5; en 11 de estos tratamientos se observó la formación de brotes adventicios, generalmente en los tratamientos que contenían una concentración alta de citocininas con respecto a la de auxinas (Tabla 5a); el proceso organogenético observado se describe a continuación:

- Embriones en etapa precotiledonaria:

No se formaron brotes adventicios durante el cultivo de embriones en esta etapa de desarrollo.

Los embriones en etapa precotiledonaria cultivados en los tratamientos organogenéticos (Tabla 5a) iniciaron un proceso de proliferación celular que los llevó a aumentar su tamaño entre un 200% y un 300% en un lapso de 12 semanas, originando un callo verde tenue. No obstante, después del primer subcultivo en un medio libre de RCV, a las 12 y 16 semanas (consideradas desde el primer día de cultivo) de cultivo iniciaron un proceso de oxidación que los llevó a morir después de aproximadamente 20 semanas de haber sido cultivados.

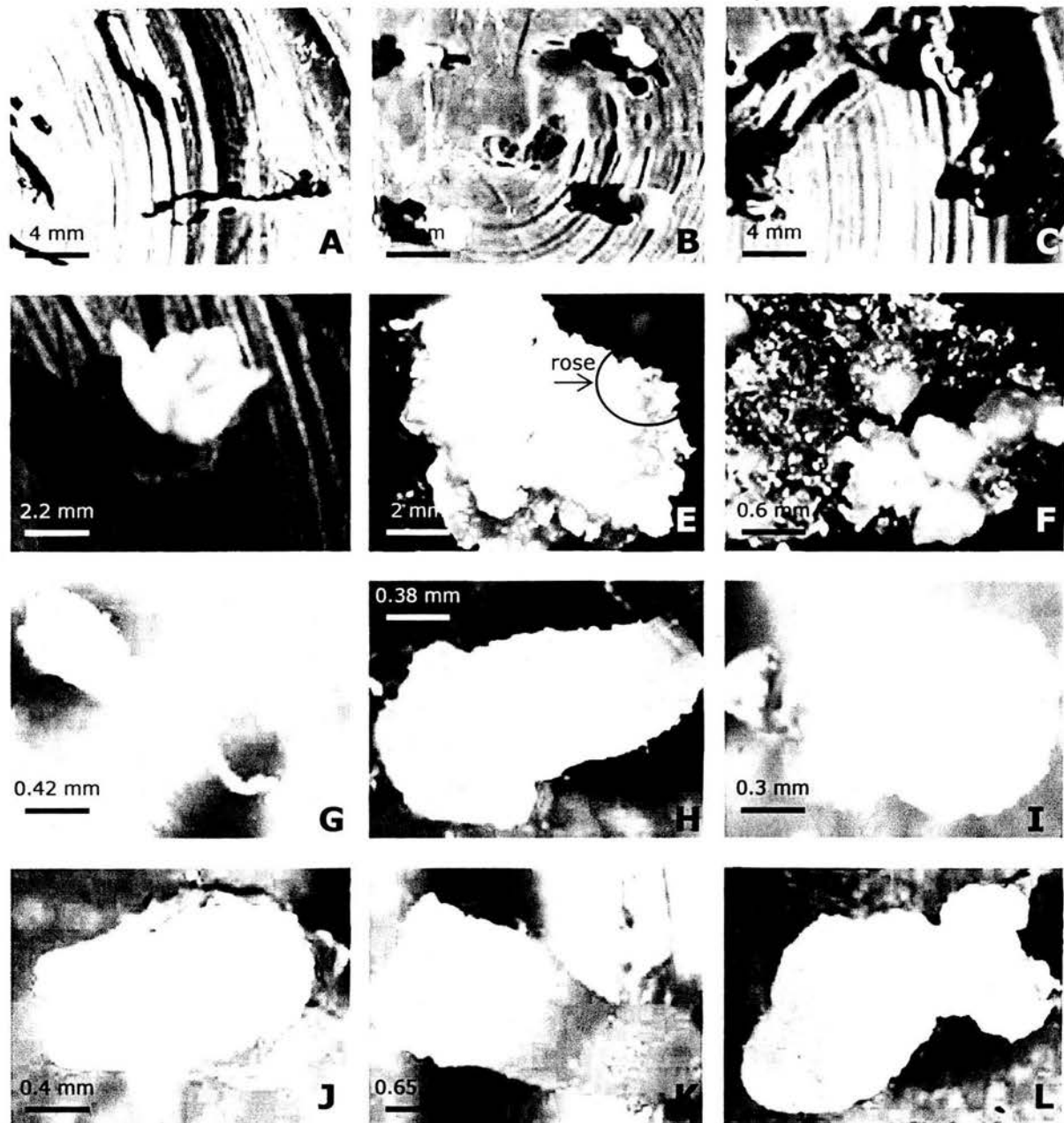


Figura 16- Respuesta de embriones *P. macrolepis* a los RCV en diferentes etapas de desarrollo. (A) Embriones testigos, alargados y cloróticos. (B) Embriones en tratamientos organogénéticos (mayores concentraciones de Kin con respecto a las de 2,4-D). (C) Embriones oxidados en tratamientos organogénéticos. (D) Embrión de *P. macrolepis* con primordios foliares. (E) Embrión de *P. macrolepis* blanquecino-verdoso con rosetas (rose). (F) Embrión oxidado de *P. macrolepis* con rosetas, en tratamientos organogénéticos. (G, H e I) Respuesta de embriones en etapa precotiledonaria a tratamientos que inducen callo blanquecino (mayores concentraciones de 2,4-D con respecto a las de Kin), nótese que la respuesta inicia con una proliferación celular generalizada en todo el embrión. (J) Respuesta de embriones en etapa cotiledonaria a tratamientos que inducen callo blanquecino, nótese que la respuesta inició en algunos casos con la proliferación celular en hipocótilo y los cotiledones adquirieron un color verde que más tarde se volvió blanco por la ausencia de luz; en otros casos inició con la proliferación celular en los cotiledones (K); y en muchos casos la proliferación fue generalizada en todo el embrión (L).

- Embriones en etapa cotiledonar:

- Semanas de cultivo 1 a 4:

Durante la primera semana de cultivo, los embriones (de 2 y 3 mm) alcanzaron longitudes de 5.0 a 5.5 mm, y en algunos casos los cotiledones se separaron por la presión que ejercen los tejidos al hincharse. Aparecieron tonos verde tenues, haciéndose más evidentes en los cotiledones y la parte superior del hipocótilo, el resto presentó un color amarillo pálido; el tejido en estas estructuras fue compacto (Fig. 16 B)

La radícula mostró una apariencia hialina amarillenta. Además, en algunos casos se veía hinchada y ligeramente granulosa mientras que el resto del embrión fue de textura lisa. En general, la radícula comenzó a oxidarse, presentando colores café claros.

- Semanas 5 a 20.

Durante la semana 5 o 6 de cultivo, la mayoría de los embriones que respondieron durante las primeras semanas se oxidaron (Fig. 16 C), aunque sobre algunos de ellos aparecieron unas pequeñas protuberancias denominadas nódulos, que se iniciaron sobre el tejido verdoso y compacto. A partir de estas protuberancias, se diferenciaron primordios foliares, los cuales fueron alargándose paulatinamente dando lugar a agrupaciones de hojas en forma de roseta (Fig. 16 D y E), siendo las hojas externas de mayor longitud (entre 3 y 7 mm) que las internas (entre 1 y 3 mm). Estas agrupaciones posteriormente dieron lugar a brotes, que llegaron a tener una altura máxima de 0.5 cm, sin embargo tuvieron una coloración amarillenta causada por la ausencia de luz.

Los embriones con este tipo de respuesta se dividieron en dos grupos, uno se conservó en oscuridad y el otro después de la 4 semana de cultivo en oscuridad se paso a condiciones de iluminación (con un fotoperiodo de 16h luz) con la finalidad de observar si presentaban alguna otra respuesta morfogénica; sin embargo, todos los embriones se oxidaron y murieron (Fig. 16 F), observando con esto que cuando se ha iniciado un proceso de organogénesis, la luz es de vital importancia en los cultivos *in vitro*.

Algunos de estos embriones se mantuvieron en cultivo por más de 20 semanas, sin embargo, desde el primer subcultivo, (después de 8 semanas de cultivo) el proceso de oxidación se inició y en todos los casos este fue el origen de la muerte de los explantes y la causa por la cual se desecharon.

c) Formación de callo blanquecino.

Los embriones recolectados en 2002 y los de 2003 fueron cultivados en los medios nutritivos SH y MS respectivamente, adicionados únicamente con 8 tratamientos de RCV (Tabla 5a); esto debido a que en el cultivo de los embriones de 2001 se observó que con estos 8 tratamientos se originó un callo blanquecino parecido al reportado para embriogénesis somática, por lo que se eliminaron 11 tratamientos restantes y solo se contemplaron los tratamientos de la tabla 14.

Tabla 14. Combinaciones y concentraciones (mg/l) de reguladores de crecimiento para la inducción de callo blanquecino a partir de embriones cigóticos de *P. macrolepis* cultivados *in vitro*.

2,4-D/K mg/l		2,4-D	
		2	3
K	0	I 2/0	V 3/0
	0.5	II 2/0.5	VI 3/0.5
	1	III 2/1	VII 3/1
	2	IV 2/2	VIII 3/2

Durante las primeras semanas de cultivo se presentaron diferentes tipos de respuesta; que estuvieron en función de los medios nutritivos utilizados, de los tratamientos con RCV y de la etapa de maduración del embrión, observando lo siguiente:

- Embriones en etapa precotiledonaria:

Los embriones en etapa precotiledonaria, recolectados en mayo y junio de 2003 correspondieron a la etapa más inmadura observada en esta investigación (Fig. 13 D) y no presentaron ningún cambio morfogénético cuando fueron cultivados. Por otro lado, únicamente el 3% de los embriones recolectados en la segunda quincena de julio (13 de julio) de 2003 (Fig. 13 E) y entre el 40 y 60 % del resto de los embriones en esta etapa de desarrollo (Fig. 13 F) se hincharon, se alargaron e iniciaron un proceso de proliferación celular (Fig. 16 G-I), que dio origen a un callo translúcido a blanquecino en un periodo de aproximadamente 3-5 semanas (Fig. 17 A). La consistencia fue variable pudiendo ser mucilaginoso, friable o compacta (Fig. 17 B, C y D). Cabe señalar que no se logró relacionar la consistencia con algún tratamiento en particular.

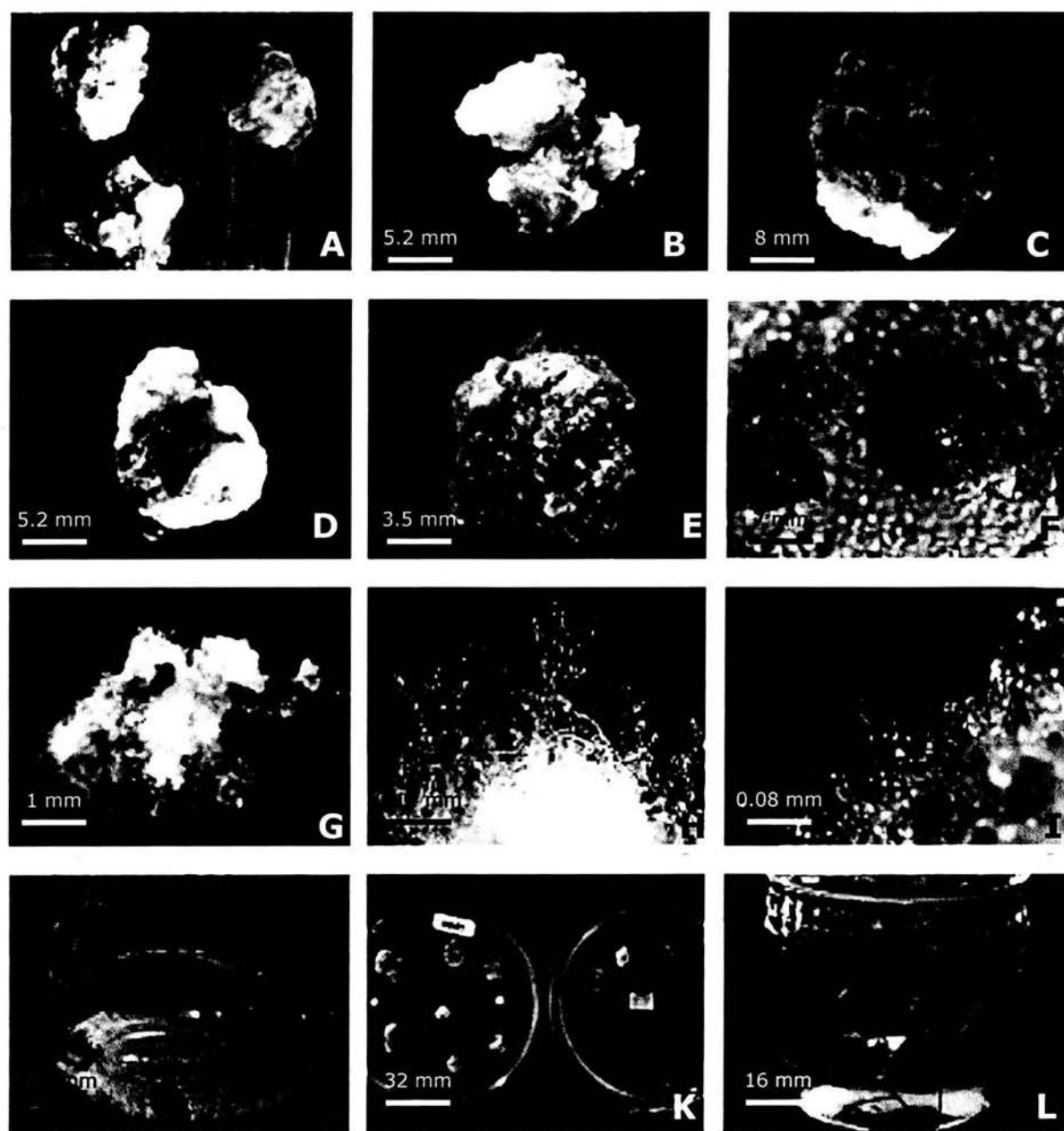


Figura 17- Respuesta de embriones de *P. macrolepis* a los tratamientos con RCV y recipientes de cultivo utilizados. (A) Callo blanquecino obtenido a partir de embriones en ambas etapas de desarrollo (precotiledonara y cotiledonaria). (B) Callo traslucido de consistencia mucilaginoso. (C) Callo blanquecino de consistencia friable. (D) Callo blanquecino de consistencia compacta. (E) Callo verdoso de consistencia compacta. (F) Callos oxidados. (G) Callo con filamentos hialinos. (H e I) Filamentos hialinos parecidos a embriones somáticos reportados para otras especies de coníferas. (J) Cultivo de callos en medios líquidos; en cajas de Petri (K) y en frascos Gerber® (L).

Los callos blanquecinos obtenidos alcanzaron un diámetro de entre 0.5 y 1 cm, sin embargo, después de 10 semanas de cultivo iniciaron un proceso de oxidación que se acentuó después del primer subcultivo en un medio libre de RCV (12 y 16 semanas después de cultivo) (Fig. 17 F).

- Embriones en etapa cotiledonaria:

Los embriones de esta etapa mostraron una respuesta similar a la de los embriones en etapa precotiledonaria recolectados después de la segunda quincena de julio; se hincharon y se alargaron, con la diferencia de que adquirieron una coloración rosada en la porción superior del hipocótilo después de 5 días. La radícula adquirió una coloración café clara que más tarde se oxidó; en general esta estructura se desprendió del resto del embrión en el primer subcultivo.

Después de aproximadamente 15 días de cultivo, iniciaron un proceso de proliferación celular, comenzando en el hipocótilo, que dio origen a la formación de un callo blanquecino (Fig. 16 J-L; Fig. 17 A); de consistencia friable en la mayoría de los casos, además, mucilaginoso, esponjoso y compacto. El callo blanquecino originado a partir de embriones en esta etapa de desarrollo alcanzó diámetros hasta de 2 cm en un periodo de 20 semanas aproximadamente. Algunos de estos callos fueron cortados por la mitad, observando que contenían una gran cantidad de líquido.

Cabe señalar que algunos callos blanquecinos, después de 12 y 16 semanas de cultivo se pasaron a condiciones de iluminación (con un fotoperiodo de 16h luz), observando que adquirieron una coloración verde intensa aproximadamente en cuatro semanas (Fig. 17 E) (se ha reportado que este tipo de callos no es embriogénico); ninguno de estos callos dio origen a brotes adventicios u otra estructura.

Al igual que los callos obtenidos a partir de embriones en etapa precotiledonaria, estos iniciaron un proceso de oxidación que se acentuó después del primer subcultivo a un medio libre de RCV.

9.3.1 Análisis histológico.

Debido a que morfológicamente no se observaron embriones somáticos y con el propósito de verificar si existían estructuras proembriogénicas y/o embriogénicas en los callos obtenidos, se realizaron cortes histológicos en callos de los tratamientos que exhibieron algunas respuestas, tales como: tejido mucilaginoso y compacto, callo verde y blanquecino, con y sin tricomas.

Con el estudio histológico se observaron diferentes tipos celulares entre los que destacaron (en orden de abundancia): A) *Células de callo*, que se distinguieron por ser células grandes, ópticamente vacías debido a la presencia de una gran vacuola en su interior que relega el núcleo a la periferia, a veces con espacios intercelulares, con y sin inclusiones (probablemente taninos); este tipo de células con y sin inclusiones se encontraron en todos los callos estudiados de todos los tratamientos (Tabla 15). B) *Células meristemáticas*, claramente formadas con paredes primarias, pequeñas, con núcleo conspicuo que ocupa la parte central de la célula y sin espacios intercelulares; este tipo de células se observaron únicamente en los tratamientos I, III, V y VII (Tabla 15). C) *Traqueidas* formándose *de novo*, estos se observaron en callos de los tratamientos V y VIII (Tabla 15).

Tabla 15. Observaciones histológicas realizadas a callos de *P. macrolepis*.

TRATAM.	OBSERVACIONES		OBSERVACIONES (RESULTADOS)			
	INCLUSIÓN	TRICOMAS	CELULAS DE CALLO	TANINOS	CELULAS MERISTEMÁTICAS	TRAQUEIDAS
I	PA-LRW	X	X	X	X	
II	PA-LRW		X	X		
III	PA-LRW		X	X	X	
IV	PA-LRW		X	X		
V	PA-LRW		X	X	X	X
VI						
VII	PA-LRW		X	X	X	
VIII	PA-LRW	X	X	X		X

Nota: PRECOT - precotiledonaria; COT - cotiledonaria; PA – parafina; LRW – LRWhite.

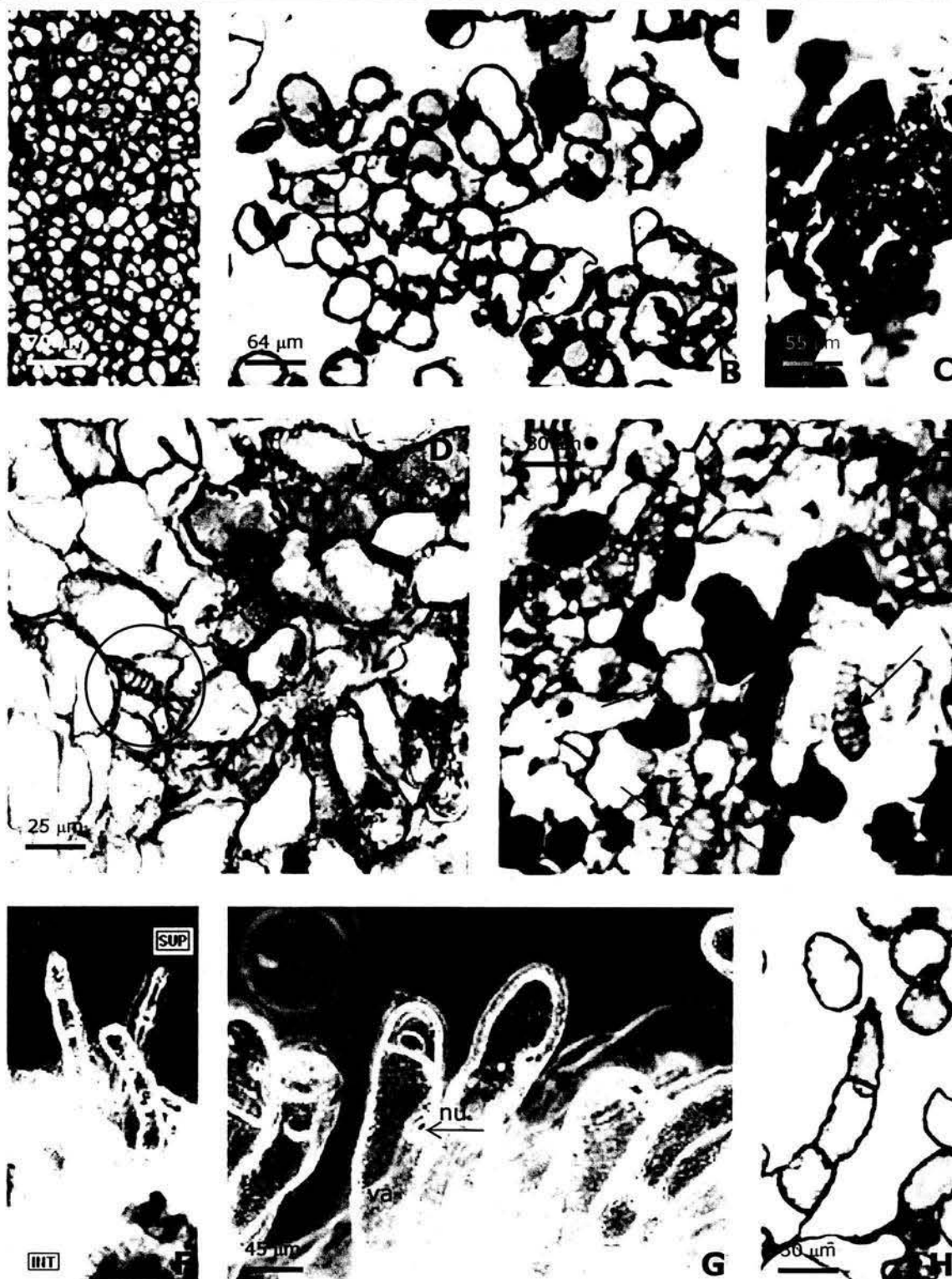


Figura 18. Análisis histológico de callos de *P. macrolepis*. (A) Células de callo constituyendo tejido compacto. (B) Células de callo distribuidas en tejido laxo. (C) Células con inclusiones probablemente taninos condensados. (D) Formación de traqueidas *de novo*. (E) Formación de traqueidas *de novo* (traqueidas), nótese la forma espiralada de la pared secundaria. (F) Filamentos hialinos en la superficie del callo. (G) Acercamiento de filamentos hialinos, nótese la grande vacuola (va) que ocupa toda la célula relegando el núcleo (nu) a la periferia. (H) Conjunto de células alargadas, probablemente tricomas.

A) Células de callo: La disposición de estas células varió dependiendo de su ubicación en el explante; se observó que las células que se encontraron en la superficie en contacto con el medio de cultivo y en el centro del explante presentaron un aglutinamiento mayor con escasos espacios intercelulares. (Figura 18 A). Por otro lado, en la superficie alejada del medio de cultivo las células se encontraron más laxamente dispuestas, con grandes espacios intercelulares (Figura 18 B). Así mismo, se observó que hacia las regiones superficiales del callo, las células contenían una gran cantidad de inclusiones, probablemente taninos (Figura 18 C). También se observaron nódulos de células parenquimáticas que recuerda a la formación de centros meristemáticos (Fig. 19 G). Los callos presentaron grandes cantidades de líquido en su interior y la mayoría fueron de consistencia friable.

B) Células meristemáticas: En callos provenientes de los tratamientos I, III, V y VII se observó la formación de células de apariencia meristemáticas aisladas o formando grupos de hasta cinco células entre células parenquimáticas y ubicadas en hacia el interior del explante (Tratamientos III, V y VIII) (Fig. 19 B, C, D y E). Cabe señalar que en algunos casos estas células meristemáticas se encontraban en intenso proceso de división celular; en la figura 19 B claramente se observa que una de las células esta en anafase y otra en profase, es notable lo delgado que son las paredes celulares. Es posible que estas células de apariencia meristemáticas se encontraran en proceso de formación de estructuras tales como embriones somáticos; no obstante, no es posible asegurar que se tratara de las primeras etapas de embriogénesis somática debido a la ausencia de estructuras como cabezas embrionales y suspensores. Este tipo de células se observó en callos de entre 3 y 5 meses de cultivo, sin embargo no se determinó una relación temporal con la presencia de células meristemáticas debido a que no se realizó un seguimiento continuo de los embriones cultivados.

Así mismo se observaron centros meristemáticos delimitados por células parenquimáticas con una gran cantidad de inclusiones (Tratamiento I) (Fig. 19 A y F). Entre los centros meristemáticos observados llama la atención uno de forma globular que aparentemente surge de la parte interna del explante (Fig. 19 F); se encontró rodeado por células parenquimáticas con inclusiones. Este centro meristemático que pudo haber estado en proceso de formación de un brote fue observado a partir del corte histológico de un callo obtenido del cultivo de un embrión en etapa cotiledonaria en el tratamiento I.

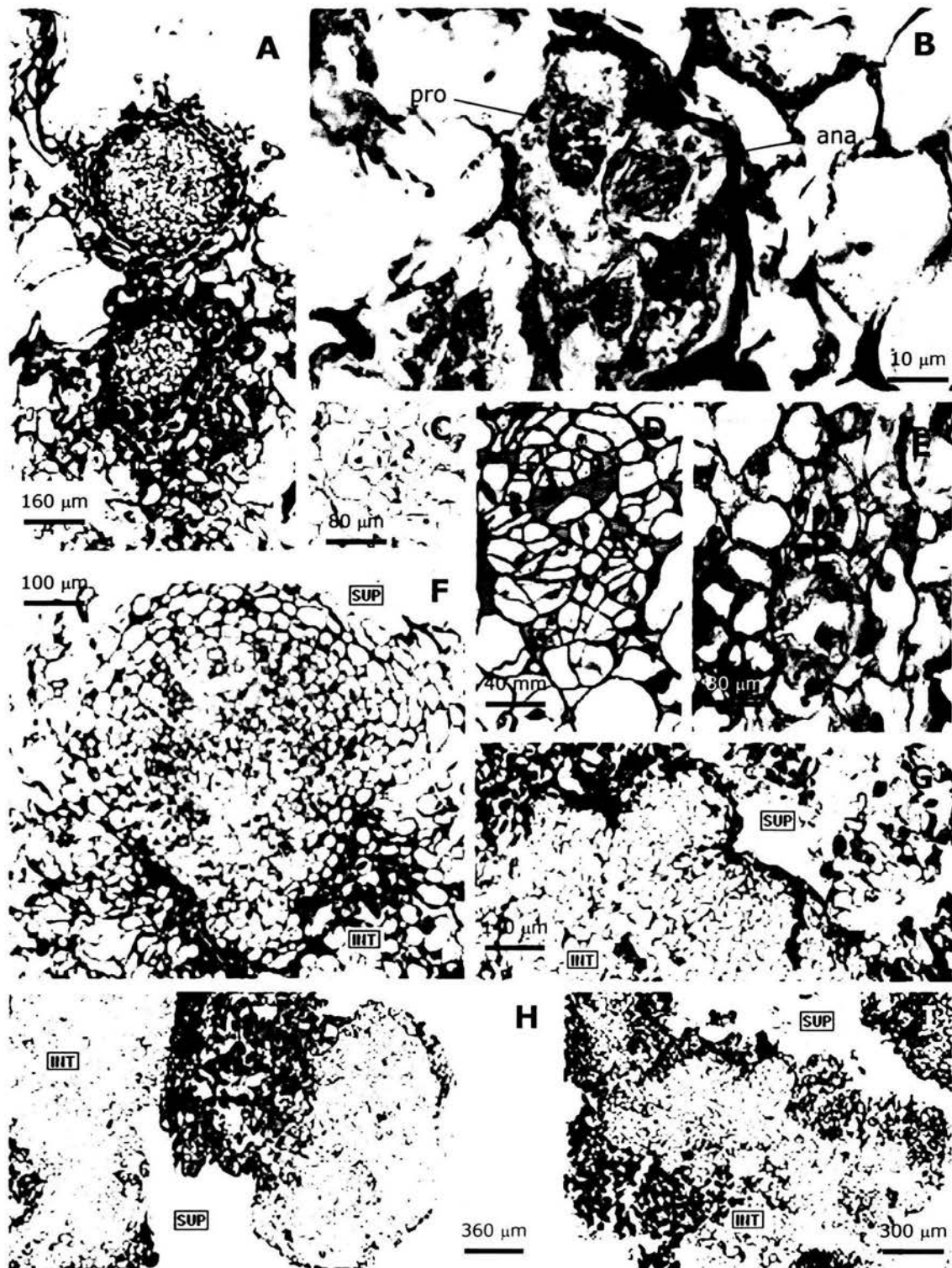


Figura 19. Observaciones histológicas obtenidas a partir de cortes de callos de *P. macrolepis* en diferentes estados de desarrollo cultivados en distintos tratamientos con RCV. (A) Centros meristemáticos rodeados por células con inclusiones. (B) Células meristemáticas en división, nótese que una célula se encuentra en anafase (ana) y otra en profase (pro). (C, D y E) Grupos de células meristemáticas. (F) Centro meristmático en forma globular que rompe la superficie de callo para surgir. (G) Nódulos de células parenquimáticas. (H e I) Explantes con intensa actividad celular en donde se observan células meristemáticas y parenquimáticas.

[INT]: interior del explante.

[SUP] superficie del explante

Es importante señalar que en callos que se mantuvieron en cultivo entre 3 y 5 meses en los tratamientos III y V, obtenidos a partir de embriones en las ultimas fases de la etapa precotiledonaria, se observó intensa actividad celular presentando células de parenquimáticas y células mersitemáticas, la superficie del los explantes se encontró rodeada por células con inclusiones diversas que pudieron ser taninos condensados (Fig. 19 H e I); no se observó alguna estructura determinada.

C) Traqueidas: Entre las células parenquimáticas de explante de los tratamientos V y VIII se dio la rediferenciación de estas en elementos de haces conductores (traqueidas) con deposición de pared secundaria en forma espiralada (Figura 18 D y E).

Con respecto a las estructuras filamentosas, alargadas, hialinas, parenquimatosas con grandes vacuolas que relegan el núcleo hacia la periferia haciéndolas ópticamente vacías (Figura 18 F, G y H) que se presentaron después de 4 y 5 meses de cultivo en embriones (en etapa cotiledonaria) de los tratamientos I y VIII, se observó que estas finas y delicadas estructuras no se conservaron a lo largo del procedimiento de deshidratación e inclusión, por lo que se realizó una preparación *in vivo* (18 F y G) y se determinó qué se trataba de tricomas. No obstante, morfológicamente tenían el aspecto de lo que se ha reportado como embriones somáticos en las primeras etapas de su formación; filamentos delgados, entrelazados, de aspecto hialino y húmedo (Fig. 17 E y F).

9.3.2 Otras respuestas del cultivo *in vitro*.

- Megagametofitos.

En el presente estudio se cultivaron megagametofitos intactos (con embrión) y cortados a la mitad (sin embrión) en estado inmaduro y maduro, con la parte interior en contacto con el medio de cultivo. Se observó que los megagametofitos cultivados en el medio SH se colapsaron en contraste con los megagametofitos cultivados en el medio MS, en donde lucían hinchados, no obstante, al paso del tiempo en cultivo estas estructuras se oxidaron y murieron.

- Protocolos establecidos para la obtención de embriogénesis somática de *Pseudotsuga*.

Se establecieron las mismas condiciones experimentadas por algunos investigadores para la obtención de ES de *P. menziesii*. Embriones se cultivaron en etapa cotiledonaria y precotiledonaria en el medio MS reducido al 50% de sus componentes inorgánicos

adicionado con: L-glutamina, hidrolizado de caseína, 2,4-D (50 μM); K (20 μM) y BAP (20 μM); solidificado con 6% de agar bacteriológico; observando la formación de callo blanquecino mucilaginoso, después de 4 semanas de cultivo, no tan proliferativo en comparación al obtenido con los tratamientos con SH utilizados en este trabajo, que se oxidó rápidamente.

Por otro lado, cotiledones obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros también se cultivaron sobre el medio SH al 100%, libre de RCV, con un fotoperiodo de 16h luz; los cotiledones fueron cortados después de 10 y 15 días de germinación y cultivados en el medio MS adicionado con 5.3 μM de ANA o 4.5 μM de 2,4-D sin citocininas y mantenidos en oscuridad. En este caso se observó que los cotiledones se oxidaron después de 8 semanas de cultivo sin presentar alguna respuesta.

- Respuestas según la procedencia de la semilla.

Es importante recordar que los embriones recolectados durante el año 2003 fueron más inmaduros que los recolectados durante 2001 y 2002, y que todos fueron recolectados en diferentes árboles y localidades (Tablas 10, 11 y 12).

Se observó que los embriones en etapa precotiledonaria, recolectados en 2002 y cultivados en los tratamientos **I** (2/0 mg/l 2,4-D/K) y **V** (3/0 mg/l 2,4-D/K) (Tabla 13) no respondieron, en contraste con los embriones en la misma etapa recolectados en 2001 y 2003 que llegaron a formar callos blanquecinos; en algunos casos los embriones de 2001 se hincharon y alargaron el doble o triple de su tamaño y finalmente todos se oxidaron. Así mismo, se observó que los embriones en etapa cotiledonaria de los 3 años de recolección respondieron de igual forma, indistintamente de la procedencia.

- Respuesta según el medio nutritivo (SH y MS).

Los embriones cultivados sobre el medio SH formaron un callo blanquecino de consistencia friable y en algunas ocasiones se observó la formación de tejido de consistencia mucilaginoso que poco después se hizo friable. También, algunos callos obtenidos en el medio SH crecieron más de 2 cm de diámetro lo cual demuestra una abundante proliferación celular.

Se observó que los embriones cultivados sobre el medio MS formaron un callo blanquecino mucilaginoso, este tipo de tejido se hizo evidente después de 15 días de

cultivo; cabe mencionar que fue menos prolífico y el proceso de oxidación fue más rápido con respecto al callo friable obtenido con SH.

- Respuestas de cultivos en medios líquidos.

Se intentó establecer cultivos líquidos de *P. macrolepis* utilizando el medio de cultivo SH con diferentes condiciones descritas en la tabla 6 (tratamientos G, H e I). Se utilizaron callos blanquecinos de consistencia mucilaginoso y friable, obtenidos a partir del cultivo de embriones cigóticos en diferentes etapas de desarrollo que fueron colocados en medio líquido en agitación; sin embargo, no se observó que los callos se disgregaran, al contrario, adquirieron una consistencia compacta y después de 20 días (aprox.) de cultivo comenzaron a oxidarse (Fig. 17 J)

- Oxidación de los tejidos.

El proceso de oxidación se presentó en todos los embriones y callos de este trabajo, iniciando con la presencia de un tono amarillento que se tornó café claro, hasta llegar a ser café oscuro en la superficie de los explantes; este proceso tardó alrededor de 8 semanas. Para intentar retardar y evitar la oxidación se realizaron diferentes ensayos: básicamente consistieron en probar diferentes condiciones en el medio de cultivo. Estas condiciones estuvieron en función de la adición de agentes antioxidantes como: polivinilpirrolidona (PVP), ácido cítrico y ascórbico, carbón activado y RCV (Tabla 6).

PVP.

La concentración inicial de PVP utilizada en los medios nutritivos fue de 0.250 g/l; esta concentración se aumentó a 0.300 g/l (tratamientos F y G; tabla 6), observando que los callos se oxidaron más rápido.

Ácido cítrico, ascórbico y carbón activado.

Con la adición de estos agentes (tratamiento A; Tabla 6), el proceso oxidativo de los explantes se retrasó de 2 a 3 semanas, aunque no se logró detener.

RCV.

Los embriones se mantuvieron en oscuridad durante 12 y hasta 16 meses en los medios nutritivos adicionados con reguladores de crecimiento. Cuando los callos (obtenidos a partir de los embriones cigóticos en cultivo) fueron subcultivados en medios libres de RCV se oxidaron velozmente; por tal motivo los subcultivos se realizaron en medios nutritivos adicionados con 50% y 100% de la concentración original de cada tratamiento de RCV

(tratamientos D y E; Tabla 6), observando que, al igual que con la adición de ácido cítrico, ascórbico y carbón activado el proceso de oxidación se retardó de 3 a 4 semanas, principalmente con la concentración al 100%, aunque no se detuvo. Conjuntamente, se usaron recipientes más grandes que las cajas de Petri normales (Fig. 17 K), tales como frascos Gerber® (Fig. 17 L) y cajas Magenta®, no obstante, no se presentó ninguna diferencia entre el uso de estos recipientes.

- Aparición de tricomas.

Sobre algunos callos cultivados en el medio SH (Fig. 17 G), después de 5 o 6 meses comenzaron a formarse unas finas estructuras alargadas y translúcidas (Fig. 17 H e I), que recuerdan la formación de ES de algunas especies. En esta investigación los callos que presentaron estas estructuras fueron originados a partir de embriones en etapa cotiledonaria, en los tratamientos **I** y **VIII** (Tabla 14). Callos que presentaron estas estructuras fueron sometidos a un proceso histológico para verificar con exactitud de que se trataba.

9.4- Discusión cultivo de embriones cigóticos.

Se sabe que la respuesta morfogénica de un explante en cultivo está determinada por un sin fin de factores entre los que destacan su estado fisiológico, la época en que ha sido recolectado, el estado fisiológico de la planta madre, la información genética y las condiciones de cultivo. Entre estas últimas destacan el medio de cultivo, RCV (concentración, tipo, combinación), agentes solidificante, temperatura, pH, humedad e iluminación. Si alguno de estos factores no es considerado, es posible que el explante muera, o que no se obtenga la respuesta deseada (Murashige, 1974; Thorpe y Patel 1984; Pierik, 1987; Tautorius *et al.*, 1991; Thorpe *et al.*, 1991; George, 1993; Monnier, 1995). Los tipos de respuesta observados en esta investigación estuvieron en función de la combinación de varios de estos factores.

- Testigo.

A pesar de la falta de iluminación los embriones cigóticos testigo germinaron como una planta normal, pero se oxidaron y murieron antes de formar primordios foliares. Esta misma respuesta se ha observado en investigaciones anteriores en donde se cultivaron embriones cigóticos maduros, no obstante, debido a las condiciones de iluminación estos germinaban originando una plántula completa normal (Monjarás, 2001). La luz es un factor físico del medio ambiente del cultivo, ésta tiene un efecto sobre el desarrollo organizado de un tejido *in vitro* (Thorpe y Patel, 1984).

Es importante considerar la intensidad, calidad y la duración del fotoperiodo, los cuales dependen de las necesidades de cada especie (Binding y Krumbiegel-Schroeren, 1984; Murashige, 1974). Para el caso de *P. menziesii*, se ha reportado que los vástagos crecen mejor si son expuestos a un fotoperiodo de 16 h luz (Bonga y von Aderkas, 1992), utilizando generalmente luz blanca, fría.

Por otro lado, la falta de luz ocasionó un rápido crecimiento en los embriones (alcanzando una longitud de 2 cm); estos fueron más largos en comparación a lo observado por Monjarás (2001). Jagannathan y Marcotrigiano (1986, *fide* George, 1993), reportaron que colocar, en oscuridad durante 2 o 3 días a brotes adventicios antes de ser disectados ayuda a alargar hipocótilo y cotiledones.

- Protocolos establecidos para la obtención de embriogénesis somática del género *Pseudotsuga*.

A pesar de haber repetido las condiciones señaladas para la obtención de ES de *P. menziesii* (Aboel-Nil, 1987; Durzan y Gupta, 1987), los explantes de *P. macrolepis* no respondieron de ninguna forma.

Es importante mencionar que existen gran cantidad de protocolos para la obtención de plántulas completas mediante micropropagación *in vitro*, algunos de ellos varían en muchos aspectos tales como condiciones de iluminación, temperatura, medios nutritivos, concentraciones de RCV, agente solidificante, etc.; sin embargo, se ha reportado que las condiciones necesarias de cultivo son distintas para cada especie y en muchos casos para cada explante (aun de la misma especie) (Thorpe y Harry, 1991; George, 1993); por tal motivo, no es posible generalizarlos. Aunque, es conveniente considerar ciertas recomendaciones dependiendo de la especie con la que se trabaje.

- Megagametofitos.

En este trabajo no se observó alguna respuesta de este explante, a pesar de que fueron cultivados tanto megagametofitos sin embrión, embriones en contacto con megagametofitos, como megagametofitos intactos; esto pudo deberse a las condiciones de cultivo, probablemente las condiciones a las que fueron sometidos no fueron favorables para la proliferación de tejido embriogénico.

Con respecto a esto, Mapes y Zaerr (1981) demostraron que en *P. menziesii* el megagametofito juega un papel importante en el crecimiento de los embriones cultivados *in vitro*; también, se ha observado que la inducción de ES de algunas especies de *Pinus* ha sido exitosa cuando los megagametofitos intactos son cultivados. Así mismo, Becwar *et al.* (1990) reportaron la formación de ES a partir del cultivo de megagametofitos intactos de *Pinus tadea* que se originaron a partir del embrión cigótico y comenzaron a ser empujados, hasta salir del megagametofito. Así mismo, Percy *et al.* (2000) cultivaron megagametofitos inmaduros intactos para la inducción de ES de *Pinus monticola* Dougl.; por otro lado, Durzan y Gupta (1987) cultivaron embriones inmaduros de *P. menziesii* unidos al megagametofito mediante el suspensor observando un alto porcentaje de masas de embriones y suspensores.

Es posible que al probar otras concentraciones y combinaciones de RCV y otras formulaciones de sales minerales se observe la formación de tejido embriogénico a partir de megagametofitos de *P. macrolepis*, ya que se ha reportado la inducción de ES a partir del cultivo de megagametofitos intactos de *Larix decidua* (Nagmani y Bonga, 1985 *fide* Attree y Fowke, 1993; Lelu *et al.*, 1993; Gupta y Grob, 1995), *Abies alba* (Schuller *et al.*, 1989 *fide* Gupta y Grob, 1995), entre otras coníferas y de otras gimnospermas como *Ceratozamia mexicana*, *C. hildae*, *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea*, *Z. pumila* y *Encephalartos dyerianus* (Chávez *et al.*, 1992a; 1992b; 1992c; Jäger y van Staden, 1996).

- Respuestas según la procedencia de la semilla.

Es posible que la diferencia en la respuesta en los tratamientos **I** y **V**, entre los años 2001 y 2002-2003 de recolección estén influenciados por información genética de la planta; se ha reportado que el crecimiento y desarrollo de órganos *in vitro* están más influenciados por el genotipo que por cualquier otro factor, ya que éste determina que forma tendrá la planta, a qué temperatura óptima va a crecer, etc. (Pierik, 1987). En general, se sabe que los fenotipos son dependientes de los efectos causados por la interacción del medio ambiente y la carga genética. Los efectos de este factor pueden representar, una de las mayores restricciones en la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (George, 1993).

- Respuesta según el medio nutritivo (SH y MS).

La elección del medio de cultivo es de gran importancia ya que tanto la respuesta morfogénica como el crecimiento y la sobrevivencia del explante son afectadas por la composición de éste. En este trabajo se observó que el medio de cultivo no influyó de manera determinante en la respuesta de los embriones cultivados.

Se ha reportado que la embriogénesis somática en coníferas es iniciada exitosamente en el mismo medio nutritivo utilizado para inducir organogénesis, siempre y cuando se trate de la misma especie (Bonga y von Aderkas, 1992), por esta razón durante los cultivos de 2001 y 2002 se usó el medio nutritivo SH, que se había utilizado exitosamente en trabajos anteriores (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano 1999; Monjarás, 2001; García-Campusano, 2003). No obstante, debido a que sólo se observó la formación de algunos centros de aparición meristemática en el cultivo de 2003 se utilizó el medio SH y

el MS, con el propósito de verificar si se presentaba algún tipo de respuesta en el medio MS diferente al que se había presentado con el medio SH.

Al igual que Durzan y Gupta (1987) el medio MS utilizado en 2003 fue adicionado con hidrolizado de caseína (100 mg/l) y glutamina (400 mg/l) (cabe señalar que dichos autores no mencionan las concentraciones que utilizaron, por lo cual, para este trabajo se tomaron las concentraciones usadas en el medio B5 modificado por Litz; apéndice 2). El hidrolizado de caseína y la glutamina han sido utilizados, adicionados a los medios nutritivos para la iniciación y mantenimiento de callo embriogénico, y para el crecimiento de ES para coníferas tales como *P. menziesii* (Durzan y Gupta, 1987).

Simola y Santanen (1990 *fide* Feirer, 1995) reportaron que la omisión de hidrolizado de caseína (100 mg/l), glutamina (0.5 mM) y arginina (0.25 mM) disminuye el desarrollo de callo blanquecino, embriogénico de *Picea abies*. Contrario a esto, en esta investigación se observó que los embriones cultivados en medios que contenían hidrolizado de caseína y glutamina crecieron menos con respecto a los que fueron cultivados en medios que no lo contenían. Es necesario realizar más investigaciones al respecto.

Es importante mencionara que los callos que fueron subcultivados en medio Litz no presentaron ningún cambio importante en comparación a los callos mantenidos en los medio SH y MS; el medio Litz se utilizó debido a que contiene una concentración mayor de nitrógeno en comparación al los medio SH y MS y se ha observado que la adición de estas fuentes de nitrógeno estimula el crecimiento del callo blanquecino, embriogénico (Feirer, 1995), no obstante este evento no se presentó en los callos de *P. macrolepsi* cultivados en este trabajo, no obstante es recomendable realizar más estudios utilizando diferentes medios de cultivo que contengan diversas concentraciones de nitrógeno.

- Respuestas de cultivos en medio líquidos.

Este tipo de cultivos es de gran importancia en embriogénesis somática, ya que se ha reportado que con cultivos líquidos el desarrollo de células se hace más sincronizado; así mismo, para estimular el crecimiento de ES en muchos casos es necesario transferir los cultivos a un medio nutritivo líquido y realizar subcultivos cada 7 días (Durzan y Gupta, 1987; Stasolla y Yeung, 2003). Entre las alternativas para disminuir el proceso de oxidación en los tejidos cultivados *in vitro* se encuentra el establecimiento de cultivos en

medios líquidos que además de aumentar la sobrevivencia, disminuyen considerablemente este proceso (Dalal *et al.*, 1992; Taber *et al.*, 1998).

En este trabajo se cultivaron algunos callos obtenidos en medio SH líquidos, lamentablemente los callos no se disgregaron y se oxidaron por lo cual fueron eliminados. Se ha reportado que para obtener un alto porcentaje de proliferación de masas tejido embriogénico se recomienda el uso de medios líquidos; con este propósito Durzan y Gupta (1987) cultivaron callos mucilaginosos de *P. menziesii* en el medio de cultivo DCR adicionado con 2,4-D (5 μ M), K (2 μ M) y BAP (2 μ M), observando el desarrollo de proembriones; sin embargo no describen el proceso mediante el cual se originaron estas estructuras embriogénicas.

- Oxidación de los tejidos.

Laukkanen, (1999) menciona que la oxidación de los tejidos ha sido el mayor impedimento para el cultivo *in vitro* de plantas, la adición de los cultivos con carbón activado, ácido cítrico y ascórbico y de agentes antioxidantes tales como polivinilpirrolidona (PVP) no han logrado disminuir la incidencia de este problema.

En este trabajo se incrementó la concentración de PVP de 250 mg/l a 300 mg/l y se realizaron subcultivos en menores periodos de tiempo (cada 15-20 días) sin observar ninguna disminución. Se observó que con cada subcultivo los callos se oxidaban más rápido, probablemente a causa del estrés que este proceso les ocasionaba, aunado a esto, se ha reportado que cuando los subcultivos tardan más de 15 días el callo embriogénico se convierte en no embriogénico (Durzan y Gupta, 1987).

La oxidación es causada por altas cantidades de peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO), enzimas que intervienen en el desarrollo de la planta (en bajas cantidades). El incremento de cantidades de estas dos enzimas está ocasionada por daño celular, desórdenes nutricionales, exposición a ozono, contaminación, radiación, infecciones y salinidad alta. Las PODs con las PPO oxidan fenoles primarios a quinoles, después a taninos condensados y por último a polímeros cafés (Laukkanen *et al.*, 1999). Este fenómeno se observó en los callos de *P. macrolepis* siendo esta una probable causa de la presencia de cantidades considerables de taninos condensados en las células de callo observadas en los cortes histológicos. También se ha observado que las altas

concentraciones de PODs y PPO reducen el desarrollo y detienen el crecimiento de ES (Laukkanen *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha reportado que los recipientes de cultivo pueden influir en la oxidación debido al tamaño y la concentración de oxígeno y otros gases que pueden contener (George, 1993), por tal motivo se usaron además de cajas de Petri, frasco Gerber® y cajas magenta® observando los mismos ritmos de oxidación en comparación a las cajas de Petri.

- Aparición de tricomas.

Los tricomas son prolongaciones formadas a partir de la epidermis, en algunos casos funcionan como glándulas y son denominados pelos (Burguess, 1985). En algunos callos cultivados en este trabajo se observó la formación de tricomas (estructuras alargadas y translúcidas) parecidos a los reportados en algunas investigaciones de embriogénesis somática tales como: *Picea mariana* (von Arnold y Hakman, 1988 *fide* Tautorius *et al.*, 1991), *Picea glauca* (Attree y Fowke, 1993), *P. menziesii* (Gupta *et al.*, 1995); no obstante, en dichos trabajos estas estructuras adquirieron una coloración crema por la acumulación de sustancias, principalmente almidones, en donde se origina el cuerpo del embrión evento que no fue observando en los filamentos hialinos presentados en callos cultivados de este trabajo. Cabe señalar que los callos de *P. macrolepis* que presentaron estas estructuras fueron analizados histológicamente para comprobar que se trataba de tricomas (Fig. 18 F-H), sin embargo, al parecer estas finas estructuras se perdieron durante el proceso ya que al realizar los cortes no se observaron; por esta razón se realizaron preparaciones *in vivo* observando que se trataba de células cuyas divisiones fueron en 2do. plano formando estructuras alargadas.

- Radícula.

En general se observó que la radícula se oxidó y desprendió del embrión, esto mismo ha sido observado anteriormente (Laurain *et al.*, 1996; García-Campusano, 1999, 2003; Monjarás, 2001); García-Campusano (2003) observó para embriones maduros de *P. macrolepis*, que se forman regiones meristemáticas en la zona del córtex que rodea al meristemo radicular, sin embargo la porción de la cofia degenera. Una posible explicación a esto puede ser que al no originarse una radícula no se generan células destinadas a formar la cofia y por ello degenera (García-Campusano, 2003).

RCV

Entre los factores más importantes en el cultivo *in vitro* se encuentra la presencia de RCV, estos determinan en gran medida el tipo de respuesta morfogénica del explante y son sustancias que actúan como señales en la promoción de la expresión de genes que resultan en una respuesta bioquímica y/o fisiológica (Davies, 1990; Arteca, 1996). De éstos, las auxinas y las citocininas han sido los más estudiados debido a que se encuentran involucrados en la división y diferenciación celular de los cultivos vegetales (Hall, 1976; George, 1993). Se ha observado que la división celular parece estar regulada por la acción conjunta de los dos, aparentemente cada uno parece estar influenciando diferentes fases del ciclo (George, 1993).

En este trabajo se probaron diferentes concentraciones de la combinación de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y Kinetina en diferentes concentraciones observando dos tipos diferentes de respuesta: organogénesis y formación de callo blanquecino. Se ha reportado que la interacción de estos RCV en el cultivo *in vitro*, morfogénicamente induce diferentes tipos de respuesta dependiendo de la relación en que se encuentren. Se ha observado que la formación de órganos adventicios generalmente requiere de la adición de auxinas más citocininas; la concentración de cada uno difiere de acuerdo con el tipo de planta y el órgano u órganos que se pretendan obtener. De esta forma, para obtener raíces, en la inducción de callo en monocotiledóneas y para la primera etapa de embriogénesis somática, se requiere una mayor adición de auxinas con relación a la de citocininas. En cambio, para inducir la formación de brotes adventicios (organogénesis) e iniciación de callo en dicotiledóneas y para la iniciación y proliferación de brotes axilares en cultivo, se requiere una mayor adición de citocininas con relación a la de auxinas (George, 1993).

9.4.1- Organogénesis.

Para *P. macrolepis* se han realizado diversos trabajos de micropropagación para la obtención de brotes adventicios vía organogénesis, utilizando diferentes combinaciones y concentraciones de RCV, principalmente ANA, 2,4-D, BA y Kinetina, la condición general es la concentración de citocininas considerablemente más alta en comparación a la de auxinas (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano 1999; Monjarás, 2001; García-Campusano, 2003); esto mismo se observa en la mayoría de los trabajos reportados para

la obtención de brotes adventicios en otras especies de coníferas (Thorpe y Harry, 1991; Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993).

En este trabajo se observó que a concentraciones entre 0.5 y 1 mg/l de 2,4-D en combinación con 0, 0.5, 1 y 2 mg/l de kinetina (Tabla 5a) se dio un proceso de formación de brotes adventicios, vía organogénesis directa. Se ha reportado que la adición de auxinas en algunos casos incrementan el proceso organogenético, tal es el caso de *P. menziesii* (Cheng, 1977). No obstante, en trabajos como el realizado con *P. macrolepis* se ha observado un resultado indistinto, entre la adición únicamente de citocininas o la combinación citocininas-auxinas ya que con un tratamiento que no contenía auxinas (2,4-D/K 0/5 mg/l) se obtuvo la misma respuesta que los que sí contenían este regulador; en este caso, el factor determinante para la obtención de brotes adventicios fueron las citocininas (Monjarás, 2001).

A diferencia de lo observado durante la segunda semana de cultivo en trabajos previos (Monjarás, 2001), con respecto al aumento de la longitud de los embriones de *P. macrolepis* que fue de 4.5 a 7.0 mm, en este trabajo el crecimiento de los embriones fue más lento, esto probablemente debido a la ausencia de luz y a la diferencia en la concentración de RCV.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

De la misma manera, la formación de brotes en este caso fue entre dos y cuatro semanas más lenta, y la cantidad de protuberancias nodulares formadas fue menor que en trabajos antes realizados, probablemente debido a la diferencia en las concentraciones de los reguladores de crecimiento, principalmente citocininas, ya que anteriormente se utilizaron concentraciones entre 3 y 5 mg/l y la fotoperiodo (Monjarás, 2001), concentraciones que en trabajos previos se habían determinado como óptimas para la obtención de brotes adventicios de *P. macrolepis* (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999), y en el presente trabajo se usaron concentraciones entre 0.5 y 2 mg/l de citocininas. Cabe señalar que a pesar de que ya se había "optimizado" la técnica de obtención de brotes adventicios (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001) se decidió comprobar si se podrían utilizar concentraciones menores a las ya probadas.

Además de la escasa y lenta formación de protuberancias nodulares y brotes, otro de los problemas presentados por los embriones cultivados fue que no desarrollaron los brotes, quizás debido a que los embriones fueron mantenidos en condiciones de oscuridad por más de 8 semanas, al cabo de las cuales los embriones se encontraban cloróticos; y a

pesar de que posteriormente fueron pasados a condiciones de iluminación, murieron. Es posible que las condiciones de luz a las cuales los embriones fueron expuestos no hayan sido adecuadas ya que se ha observado que la calidad de la luz es muy importante para el desarrollo de hojas y del aparato fotosintético, (Sæbø *et al.*, 1995). Se ha observado en algunos casos que la oscuridad en las primeras etapas de inducción de brotes de algunas especies es favorable (George, 1993). Al parecer para *P. macrolepis* no lo fue, o el tiempo de oscuridad fue demasiado prolongado.

Esto también pudo ser el resultado de una exposición a los RCV, puesto que se ha observado que después de un largo periodo de exposición a las citocininas la acumulación de polipéptidos fotosintéticos y clorofila disminuye, lo cual coincide con una alteración del desarrollo de la membrana de los tilacoides en los plastidios de las células que se encuentran en contacto con el medio de cultivo que contiene citocininas (Mazari y Camm, 1993).

Al parecer, un factor importante y determinante para la formación de brotes adventicios de *P. macrolepis* es la presencia de luz durante el proceso, situación que puede ser constatada con los trabajos realizados anteriormente en donde este proceso morfogénico se ha realizado con un fotoperiodo de 16 horas luz (Galindo-Flores, 1996; García-Campusano, 1999; Monjarás, 2001; García-Campusano, 2003).

- El problema, enraizamiento.

Se sabe que la organogénesis es la técnica preferida para la micropropagación de árboles maderables ya que con ella se han obtenido resultados satisfactorios. La etapa de enraizamiento representa una de las principales limitantes para la micropropagación de algunas especies, principalmente de coníferas. En el caso de *P. macrolepis*, a pesar de la optimización del proceso de obtención de brotes adventicios, el enraizamiento sigue representando una de las principales limitantes para su micropropagación.

García-Campusano (1999), Monjarás (2001) realizaron trabajos de enraizamiento para *P. macrolepis*, utilizando diferentes concentraciones de RCV, principalmente auxinas como ANA, AIB, Citowin 500® y Radix 10000®; diferentes sustratos como puentes de papel filtro, mezcla de turba-vermiculita, Phytigel®, agar; diferentes condiciones de incubación (19°C, 22°C y 24°C); sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados solo se obtuvieron 3 raíces de manera espontánea y no se ha logrado establecer un protocolo adecuado para la obtención de raíces adventicias *in vitro* en esta conífera.

Haissig *et al.* (1992), mencionan que esta problemática puede ser resuelta si se encuentran los controles del enraizamiento a través de estudios genético-moleculares ya que este proceso es de gran importancia y no existe mucha información del enraizamiento *in vitro* de plántulas obtenidas mediante organogénesis. No obstante es posible realizar otros estudios, modificando concentraciones y combinaciones de RCV, sustratos, medios nutritivos, etc.

- Solución: ¿embriogénesis somática?

Mientras se dilucidan los controles que dirigen el proceso de enraizamiento *in vitro*, una de las posibles soluciones a esta problemática es la embriogénesis somática ya que con esta técnica es posible obtener embriones bipolares; además, ofrece ventajas significativas para la producción de plantas a gran escala en la silvicultura, principalmente debido al potencial de velocidad de multiplicación y a los bajos costos por planta (Aboel-Nil, 1987; Attree y Fowke, 1991; Thorpe y Harry, 1991). Sin embargo, se obtiene con poca frecuencia en comparación con otros métodos de regeneración, particularmente en especies maderables (Thorpe y Harry, 1991), ya que su éxito depende muchas veces del uso de embriones cigóticos inmaduros como explantes (Dunstan, 1988 *fide* Thorpe y Harry, 1991). Para *P. macrolepis* esta técnica ofrece una alternativa de gran importancia ya que los métodos convencionales de propagación (como la siembra de semillas en vivero) no han tenido buenos resultados y a que no se ha logrado su enraizamiento *in vitro*.

9.4.2- Formación de callo blanquecino.

Varios autores han reportado la aparición previa a la formación de ES de un "callo" blanquecino, de consistencia mucilaginosa y/o friable (Tautorius *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992; Attree y Fowke, 1993; von Arnold *et al.*, 2002), que no es más que una masa de tejido embriogénico con masas de embriones y suspensores. Debido a que la formación de callo embriogénico en coníferas se ha reportado a partir de megagametofitos y embriones en etapa precotiledonaria y cotiledonaria, en esta investigación se intentó la obtención de ES con estos explantes.

Embriones.

- Embriones en etapa precotiledonaria:

En los últimos años, se han realizado diversos trabajos de embriogénesis somática con gimnospermas usando como explantes principalmente embriones cigóticos inmaduros, debido a que se ha observado que mientras más joven sea el explante más fácil resulta inducir la embriogénesis somática (Bonga y von Aderkas, 1992). A este respecto, se ha reportado que la mayoría de los trabajos para la obtención de ES de *P. menziesii* y especies de *Pinus* han sido obtenidos con embriones en etapa precotiledonaria (Durzan y Gupta, 1987).

En este trabajo se cultivaron embriones en las primeras fases de esta etapa, recolectados durante el 2003 en la localidad de San Juan Terrenote, sin embargo, no presentaron cambio alguno, esto pudo deberse a que hayan muerto poco después de haber sido disectados y cultivados.

Con respecto a esto, Monnier (1995) menciona que al romperse o dañarse el suspensor del embrión es posible que ciertas sustancias indispensables para el desarrollo del embrión se filtren al medio de cultivo o que exista una rápida penetración de sales minerales ocasionado necrosis, la cual comienza por el suspensor y la radícula y más tarde se da la muerte completa del embrión. Es posible que el suspensor en los embriones cultivados en este trabajo haya sido dañado debido a que fue usado para sujetar al embrión durante el proceso de disección y cultivo.

También, se ha reportado que embriones demasiado jóvenes mueren horas después de haber sido cultivados, a causa de que en un principio el megagametofito proporciona protección y sustancias especiales que probablemente no se encuentran en el medio de cultivo (Monnier, 1995).

Los embriones que formaron callo fueron recolectados durante la segunda quincena del mes de julio; sin embargo, hay que considerar que no es conveniente relacionar la fecha de recolección con el estado de desarrollo de los embriones ya que el estado de desarrollo del embrión varía dependiendo del clima, localización del árbol donador, la posición del cono en el árbol y de la semilla en el cono (Nagmani *et al.*, 1995); por esto es acertado mencionar que los primeros embriones cultivados en este trabajo que respondieron se

encontraban en etapa precotiledonaria; tenían forma globular a ovalada, en donde no se distinguían cotiledones ni hipocótilo, con longitudes de 0.4 y 0.7 mm; la porción superior del cuerpo del embrión con una coloración blanquecina, textura lisa, consistencia compacta y apariencia húmeda; suspensor hialino largo.

La formación de callo blanquecino en embriones en etapa precotiledonaria, empezó a aparecer después de 15-20 días de cultivo. Durzan y Gupta (1987) reportaron la aparición de callo embriogénico después de 12 o 15 días de cultivo a partir de embriones en esta misma etapa. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de tejido embriogénico en los callos cultivados de *P. macrolepis*; es posible que el potencial embriogénico se haya perdido debido a los periodos largos de subcultivo. Ya que los embriones pasaban 3 o 4 meses en el mismo medio antes de ser transferido a un medio sin RCV.

Cabe mencionar que la mayoría de los callos obtenidos en este trabajo fueron de color blanco. Poco se ha reportado con respecto a la coloración de los callos embriogénicos, sin embargo, se ha observado que los callos de color blanco no son embriogénicos en contraste a los de color amarillento (Tautorus *et al.*, 1991; Attree y Fowke, 1993; Mauri y Manzanera 2003). Esta observación es un indicativo de que el callo blanquecino obtenido a partir del cultivo de la mayoría de los embriones de *P. macrolepis* en este trabajo no fueron embriogénicos. También es posible que esta característica se perdiera en algún momento del cultivo, ya que se observaron algunas estructuras que recordaban las primeras etapas de la formación de ES; tales como filamentos hialinos alargados y muchas veces ramificados.

- Embriones en etapa cotiledonaria:

Pocos han sido los reportes de embriogénesis somática utilizando como explantes para inducción embriones en etapa cotiledonaria; en coníferas existen reportes solo en especies de los géneros *Abies*, *Picea* y *Pinus* (Attree y Fowke, 1993; Gupta y Grob, 1995).

En este trabajo se logró observar la formación de centros meristemáticos en callos obtenidos a partir de embriones cigóticos en etapa cotiledonaria; es probable que esto mismo haya sido observado por Durzan y Gupta (1987), quienes obtuvieron 0.1% de tejido embriogénico a partir del cultivo de embriones de *P. menziesii* en esta misma

etapa; sin embargo, estos autores no describen en cuanto tiempo o como se desarrolla este tipo de tejido.

No obstante, el proceso embriogénico probablemente se detuvo; este mismo hecho se observó en *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001).

- Análisis Histológico:

Muchos han sido los reportes de embriogénesis somática en gimnospermas (Chávez *et al.*, 1992 a, b y c; Norstog y Rhamstine, 1967 *vide* Attree y Fowke, 1993; Attree y Fowke, 1991; Tautorius *et al.*, 1991; Raemakers *et al.*, 1999), sin embargo, ninguno ha sido respaldado con estudios histológicos detallados. La gran mayoría de estos reportes presentan estudios histológicos (en algunas ocasiones poco confiables) de los ES para comprobar que realmente los obtuvieron; tal es el caso de *Pseudotsuga menziesii* (Durzan y Gupta, 1987), *Picea omorika* (Budimir y Vujičić, 1992), *Ceratozamia mexicana* var. robusta (Chávez, 1993) y *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001). Filonova *et al.* (2000) demostraron que los ES de *Picea abies* se desarrollan a partir de masas proembriogénicas que pasan a través de una serie de etapas que se distinguen por tener cierta organización y número de células, siendo este el único trabajo que intenta dar una posible explicación del proceso embriogénico, al menos para coníferas.

A causa de la escasez de información, se sabe muy poco del origen y desarrollo de ES, por lo que es difícil saber si se está siguiendo el camino correcto cuando se realizan estudios histológicos de callos blanquecinos parecidos a los reportados en embriogénesis somática; este es el caso de *Pseudotsuga macrolepis*.

Al examinar los cortes histológicos realizados a partir de callos de *P. macrolepis* se observó que en todos los callos analizados había grandes células parenquimáticas, con grandes vacuolas (que en algunos casos contenían compuestos fenólicos) que relegan al núcleo a la periferia, sin un arreglo y grandes espacios intracelulares; al parecer este tipo celular es común en callos sometidos a tratamientos embriogénicos. Este tipo de células ha sido observado en tejido no embriogénico y frecuentemente relacionado con tejido embriogénico de muchas especies entre las que se encuentran *Pseudotsuga menziesii* (Durzan y Gupta, 1987); *Ceratozamia mexicana* var. robusta (Chávez, 1993) y *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001). Algunas ocasiones estas células parenquimáticas se encontraban formando grupos parecidos a los centros meristemáticos;

Pelletier y Laliberté (2000 *fide* García-Campusano, 2003), describieron la formación de nódulos parenquimáticos, sin embargo no mencionan su potencial morfogénico.

Así mismo, se observó una cantidad considerable de células parenquimáticas con inclusiones, probablemente taninos, esto principalmente en las superficies del explante y rodeando centros meristemáticos; esto mismo fue observado por García-Campusano (2003) en cultivos de embriones maduros de *P. macrolepis*. Aparentemente la presencia de taninos en células parenquimáticas es común en el cultivo de coníferas (Cheah y Cheng, 1978; Harry y Thorpe, 1994; López-Escamilla, 2000) y puede estar relacionada a diferentes procesos del cultivo *in vitro* (como oxidación) así como a una respuesta al ambiente proporcionado.

Por otro lado, en callos de consistencia compacta y sin espacios intercelulares fue posible observar algunas células meristemáticas, algunas en división, dispersas en la mayoría de los casos y algunos centros meristemáticos (constituidos por tres o más células) que pudieran ser el origen de ES. Williams y Maheswaran (1986) mencionan que todos los proembriones son derivados de células meristemáticas en división, pequeñas, con citoplasma denso, núcleo prominente y pequeñas vacuolas. No obstante, en este trabajo no se puede asegurar que se tratara de las primeras etapas de embriogénesis somática, si no más bien, al igual que para *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001), podría ser señal de que un proceso de embriogénesis se inició y luego se perdió esa capacidad en estas células para formar ES.

Para el caso de embriogénesis somática de especies como *Larix decidua* y *Cryptomeria japonica*, se describieron grupos de células meristemáticas (cuerpo del embrión) subtendidas por células alargadas que dan origen al suspensor, estructura común en coníferas, que en este caso no se observaron. Por otro lado, a pesar de que se encontraron células citoplásmicas en mitosis, no se observó el desarrollo de cabezas embrionales y suspensores, evento reportado para *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001). No obstante, morfológicamente se encontraron estructuras semejantes a las reportadas para las primeras etapas de embriogénesis somática que por ser demasiado frágiles se perdieron durante el proceso histológico.

Finalmente es conveniente hacer notar que el proceso celular que se observó en este trabajo fue totalmente diferente al obtenido por García-Campusano (2003) para *P. macrolepis* bajo condiciones organogénicas, quien reporta que a los 90 días de cultivo

de embriones maduros la protodermis seguía intacta, con inclusiones y que la forma general del embrión seguía manteniéndose; en este caso, a los 90 días de cultivo los callos obtenidos no recuerdan en nada al explante original, lo cual nos da un indicativo de que el proceso que se está dando es diferente al de organogénesis.

- Aparición de traqueidas.

Las traqueidas son estructuras que sirven a la planta para el transporte de agua y sales minerales y se encuentran localizadas conformando al xilema; su diferenciación es estimulada principalmente por auxinas y se ha reportado que estas estructuras se forman en cultivos *in vitro* como respuesta a tratamientos para retardar el crecimiento y en medios con altas concentraciones de sacarosa (Burgess, 1985).

Al igual que en los cultivos obtenidos para *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 2001) en algunos callos blanquecinos mantenidos en oscuridad así como en algunos callos verdes mantenidos en penumbra, se formaron traqueidas *de novo*.

Cabe señalar que en embriones maduros de *P. macrolepis* cultivados en un medio nutritivo para inducir organogénesis directa, se encontraron traqueidas diferenciadas *de novo* (García-Campusano, 2003), en dicho trabajo se menciona que pudieron formarse como respuesta al tratamiento con auxinas y que su formación pudo ser consecuencia de la formación de meristemas apicales. Así mismo, en cultivo de callos de *Pelargonium*, se asoció a las etapas tempranas del desarrollo de yemas apicales (George, 1993). En este caso, no se supo si la formación de traqueidas pudo haber sido el antecedente de la formación de alguna estructura debido a que los callos se oxidaron y murieron, además, no se observó su asociación a ninguna estructura en particular.

Recapitulando

Lamentablemente, durante los últimos 15 años los estudios del mejoramiento del proceso de embriogénesis somática han estado dirigidos principalmente a las etapas de maduración y germinación de embriones; razón por la cual no existen muchas investigaciones que reporten las etapas de inducción, lo que hace difícil establecer las condiciones de cultivo y en que etapas de desarrollo se debe trabajar para obtener resultados exitosos.

Fehér *et al.* (2003) proponen que condiciones de estrés, tales como la exposición de los tejidos a condiciones sub-óptimas de RCV y/o nutrimentos pueden ser usadas para inducir la formación de ES; también señala que la exposición a las condiciones "apropiadas" de estrés provocan un proceso de adaptación del explante al medio de cultivo que incluye una reprogramación de la expresión génica así como cambios fisiológicos y metabólicos que pueden iniciar un proceso embriogénico. No obstante, si las condiciones de estrés exceden el nivel de tolerancia celular, el explante muere.

Es posible que la etapa de maduración de los embriones cultivados en este trabajo, en interacción con factores tales como: proceso de recolección, desinfección y escarificación de la semilla; combinación y concentración de los componentes de los medios nutritivos, periodos largos entre cada subcultivo; concentración, tiempo de exposición y tipo de RCV; temperatura; humedad; tipo de recipiente utilizado para cultivo; condiciones nulas de iluminación; hayan causado condiciones extremas de estrés en algún punto del cultivo, razón por la cual, iniciaron un proceso de oxidación que los llevó a la muerte.

Probablemente, en algunos tratamientos (tales como el I, III, V y VII), las condiciones de estrés no fueron tan severas antes del primer subcultivo, lo cual permitió la formación de algunos centros meristemáticos, sin embargo, es posible que después del primer subcultivo el proceso se interrumpiera debido a las nuevas condiciones a las que fueron expuestos los explantes lo que ocasionó que se iniciara un proceso de oxidación y la muerte de los callos.

10- CONCLUSIONES

10.1 Recolección de material biológico.

- ☆ Se encontraron conos, megagametofitos y embriones en diferentes etapas de desarrollo y aunque no es conveniente relacionar la fecha de recolección con la etapa en la que es encontrado el embrión, es importante decir que los primeros embriones recogidos se presentaron en el mes de julio.
- ☆ Existe un alto porcentaje de semillas vanas (44.96 %), plagadas (1 %) y atacadas por roedores, aves e insectos, que disminuyen considerablemente la producción anual, aunque este porcentaje es parecido al señalado para poblaciones de Norte América.
- ☆ La producción de conos es variable aun dentro de una misma población, observando que en una misma localidad hay árboles con buena producción de semillas (1.7% de semillas vanas) y otros que tienen hasta el 100% de semillas vanas.
- ☆ Las condiciones climáticas, al menos durante la duración de este trabajo, no influyeron en la producción de semilla; atribuyendo la poca producción de semilla en algunos árboles a condiciones internas de la planta (como la edad, información genética, etc.) aunado a que no fueron años semilleros.

10.2 Cultivo de embriones cigóticos.

- ☆ Los megagametofitos en cultivo no mostraron ninguna respuesta, por lo cual se recomienda no considerarlos como explante para la inducción de embriones somáticos de *P. macrolepis* bajo las condiciones de cultivo usadas.
- ☆ Los primeros embriones de *P. macrolepis* que respondieron bajo las condiciones de cultivo a las que fueron expuestas se encontraban en etapa precotiledonaria, embriones que presentaron coloración blanquecina en la porción superior y suspensor largo hialino.
- ☆ Con concentraciones de 2 y 3 mg/l de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético se formó callo blanquecino, parecido al reportado para embriogénesis somática, independientemente de las concentraciones de citocininas usadas en esta investigación.
- ☆ No se lograron establecer las condiciones adecuadas para la embriogénesis somática; sin embargo, se observó que en tratamientos **I** (2/0 mg/l de 2,4-D/K), **III** (2/1 mg/l de 2,4-D/K), **V** (3/0 mg/l de 2,4-D/K) y **VII** (3/1 mg/l de 2,4-D/K), se formaron

células de apariencia meristemática que pudieron haber estado en proceso de formación de embriones.

- ☆ Los subcultivos son de gran importancia, tal vez acortando los períodos entre ellos sería posible la obtención de embriones somáticos.
- ☆ La oxidación representa una limitante muy importante en el cultivo *in vitro* de callos de *P. macrolepis*; a pesar de los intentos no se logró establecer un medio adecuado para controlarla y evitarla.
- ☆ Se ha establecido al menos un protocolo para la obtención de embriones somáticos para *P. menziesii* (Durzan y Gupta, 1987); este protocolo se repitió para *P. macrolepis*, sin obtener los mismos resultados; lo cual corrobora que las condiciones requeridas para la micropropagación son distintas para cada especie, cada individuo de la misma especie y aún para cada explante de la misma especie.

10.3 Conclusión general.

- ☆ No se logró obtener embriones somáticos a partir del cultivo de embriones cigóticos de *P. macrolepis* bajo las condiciones propuestas, sin embargo, se considera que el CTV ofrece grandes ventajas para la micropropagación de especies amenazadas y difíciles de propagar mediante métodos convencionales tales como esta, desafortunadamente y a pesar de los grandes avances tecnológicos y científicos estas técnicas siguen siendo en muchos casos "azarosas" debido a que intervienen muchos factores que interactúan (RCV, luz, medio nutritivo, pH, temperatura, información genética de la planta madre, del explante, etc.), además, poco se conoce acerca de los mecanismos bioquímicos y moleculares asociados con el proceso de inducción de embriogénesis somática.

Además, es importante considerar que *P. macrolepis* ha resultado ser muy difícil de tratar, debido a las condiciones genéticas y de estrés bajo las cuales se encuentran las poblaciones naturales, las cuales repercuten en su respuesta. Con trabajos como este se han logrado avances considerables para su propagación *in vitro* y es necesario continuar con estudios que permitan conocer más acerca de esta especie y finalmente lograr establecer una técnica para su propagación que conduzcan a su recuperación.

11- PERSPECTIVAS

El CTV es una herramienta de gran importancia para la recuperación de especies que se encuentran amenazadas, lamentablemente en el caso de coníferas (uno de los grupos de plantas más antiguo) y en algunas especies como *P. macrolepis* Flous ha sido difícil su aplicación debido, principalmente, a la falta de estudios relacionados al estado fisiológicos de la planta madre y del explante, genéticos relacionados con la expresión de genes en diferentes etapas de desarrollo de los explantes, expresión de genes relacionados con los RCV, etc.

La embriogénesis somática, es de gran importancia por las ventajas que ofrece, una de las más importantes es la obtención de embriones bipolares. No obstante, ha resultado ser una técnica difícil de dominar ya que cada especie tiene requerimientos específicos y las condiciones de cultivo son diferentes para cada una de ellas y a veces aún para cada individuo.

En el caso de *P. macrolepis* se han obtenido avances considerables en el cultivo de embriones para la obtención de embriogénesis somática, sin embargo, aun existen muchos aspectos por considerar para el establecimiento de esta técnica tales como: reducir la cantidad de embriones cultivados para facilitar su seguimiento y manejo, acortar los periodos de subcultivo, probar otros medios de cultivo, concentraciones y combinaciones de RCV, realizar revisiones histológicas a lo largo de todo el proceso, a partir al menos del 5to día de cultivo, entre muchas otras opciones.

12- APÉNDICES:

1- Especies de coníferas encontradas en la lista de la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo).

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	SUBESPECIE	NOMBRE COMUN	CATEGORIA	DISTRIBUCION
Cupressaceae	<i>Cupressus</i>	<i>forbesii</i>		ciprés negro	Pr	no endémica
Cupressaceae	<i>Cupressus</i>	<i>guadalupensis</i>		ciprés brillante	P	endémica
Cupressaceae	<i>Cupressus</i>	<i>lusitanica</i>			Pr	no endémica
Cupressaceae	<i>Cupressus</i>	<i>montana</i>		ciprés rugoso	Pr	no endémica
Cupressaceae	<i>Juniperus</i>	<i>californica</i>		enebro de california	Pr	no endémica
Cupressaceae	<i>Juniperus</i>	<i>monticola</i>		enebro azul	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Calocedrus</i>	<i>decurrens</i>			A	no endémica
Pinaceae	<i>Picea</i>	<i>chihuahuana</i>		pinabete espinoso	P	no endémica
Pinaceae	<i>Picea</i>	<i>martinezii</i>		pinabete de Nuevo León	P	no endémica
Pinaceae	<i>Picea</i>	<i>mexicana</i>		pinabete mexicana	P	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>atenuata</i>			Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>caribaea</i>	hondurensis	pino de Honduras	A	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>catarinae</i>		piñón de Catarina	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>contorta</i>	murrayana	pino de San Pedro Mártir	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>coulteri</i>		pino de brea	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>culminicola</i>		piñón de octubre	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>chiapensis</i>		pino de Chiapas	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>edulis</i>		piñón de Colorado	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>flexilis</i>		pino torcido	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>jaliscana</i>		pino de Jalisco	Pr	no endémica

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	SUBESPECIE	NOMBRE COMUN	CATEGORIA	DISTRIBUCION
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>jeffreyi</i>		pino negro	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>johannis</i>		piñón enano	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>lagunae</i>		piñón de la Laguna	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>martinezii</i>		pino tarasco	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>maximartinezii</i>		pino azul	P	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>monophylla</i>		piñón simple	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>muricata</i>		pino peninsular	P	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>nelsonii</i>		piñón de Nelson	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>pinceana</i>		pino piñonero- llorón	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>quadrifolia</i>		piñón de California	Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>reflexa</i>			Pr	no endémica
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>rzedowskii</i>		pino de Coalcomán	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pseudotsuga</i>	<i>flahaulti</i>			Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pseudotsuga</i>	<i>guinieri</i>		payarín tepehuano	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pseudotsuga</i>	<i>macrolepis</i>		hayarín colorado	Pr	endémica
Pinaceae	<i>Pseudotsuga</i>	<i>rehderi</i>		hayarín espinoso	Pr	endémica
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i>	<i>matudai</i>			Pr	no endémica
Taxaceae	<i>Taxus</i>	<i>globosa</i>			Pr	no endémica

2- Medios nutritivos

SCHENK Y HILDEBRANDT (Gamborg y Phillips, 1995; Hurtado y Merino, 1991)
(Modificado)

	mg/l
• MACRONUTRIMENTOS	
KNO ₃	2500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ ·2H ₂ O	200
• MICRONUTRIMENTOS	
KI	1.0
H ₃ BO ₃	5.0
MnSO ₂ ·H ₂ O	20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2
CuSO ₄ ·2H ₂ O	0.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2
• FeEDTA	
Na ₂ .EDTA	20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15
• VITAMINAS	
Piridoxina HCl	0.5
Ácido nicotínico	5.0
Tiamina HCl	5.0
Mio-inositol	1000
• OTROS	
Polivinilpirrolidona	250
Agente antivitrificante	1000
Sacarosa	30000
Phytigel®	5500
pH	5.7 – 5.8

MURASHIGE Y SKOOG (Gamborg y Phillips, 1995) (Modificado)

	mg/l
• MACRONUTRIMENTOS	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
• MICRONUTRIMENTOS	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
• FeEDTA	
Na ₂ .EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
• VITAMINAS	
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Glicina	2.0
L-Glutamina	400 (Medio Litz)
Hidrolizado de caseína	100 (Medio Litz)
• OTROS	
Polivinilpirrolidona	250
Agente antivitrificante	1000
Sacarosa	30000
Agar	7000
pH	5.7 – 5.8

B5 modificado por LITZ (Modificado)

mg/l

• **MACRONUTRIMENTOS**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
KNO_3	2500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400
KH_2PO_4	170
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200

• **MICRONUTRIMENTOS**

KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

• **FeEDTA**

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8

• **VITAMINAS**

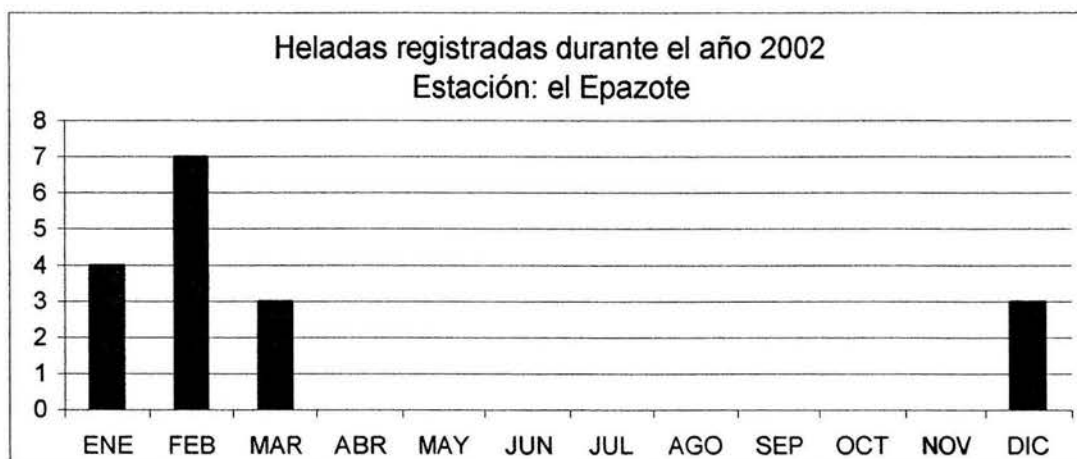
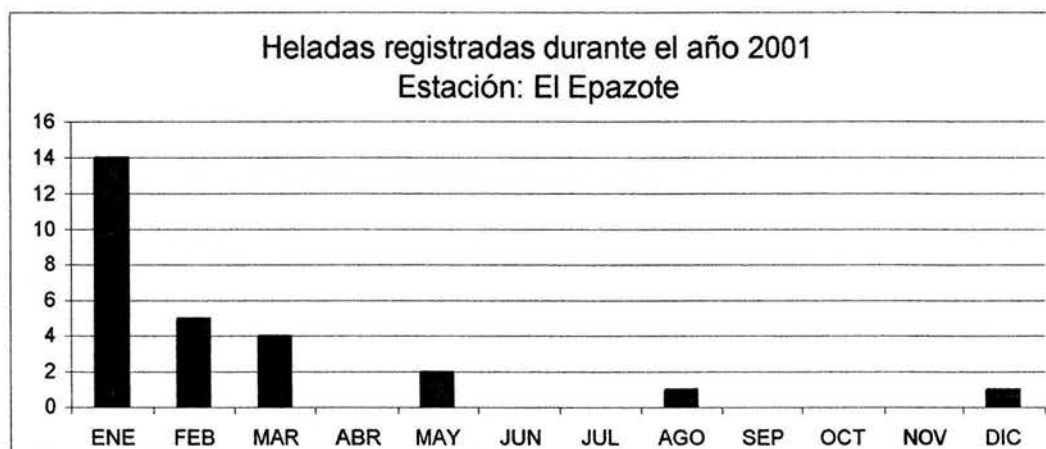
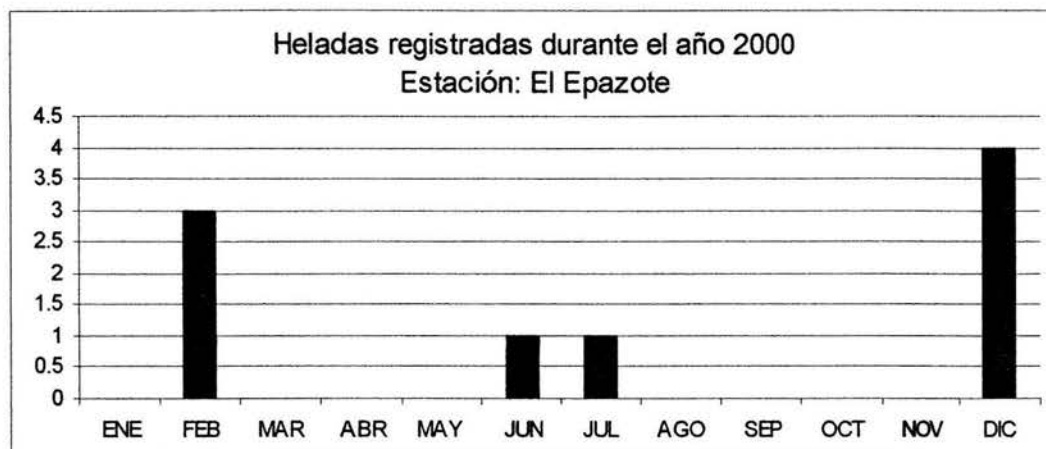
Tiamina HCl	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Glicina	2
Mio-inositol	100
L-Glutamina	400
L-Arginina	100
L-Asparagina	100
Hidrolizado de caseína	100

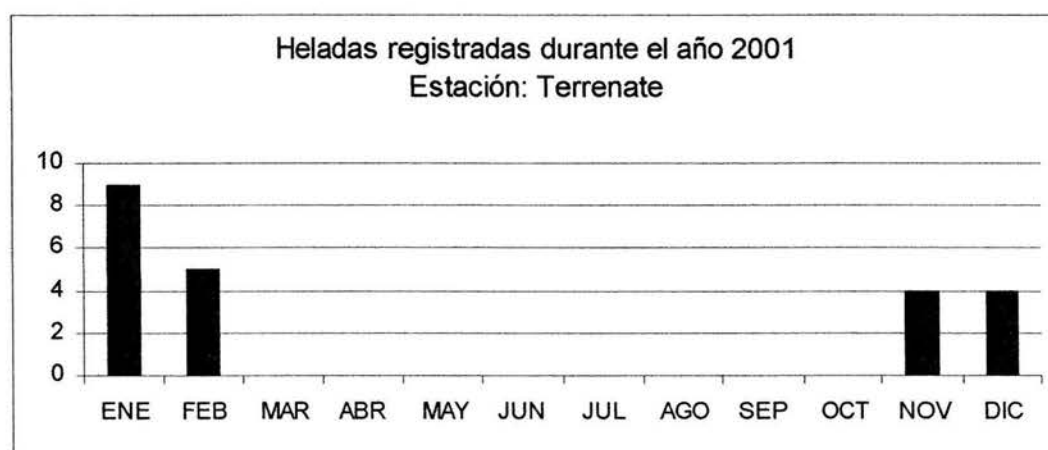
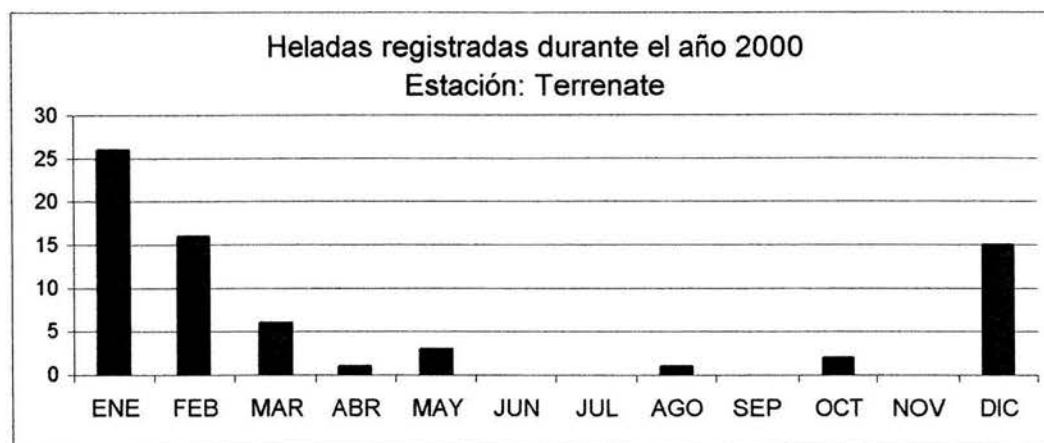
• **OTROS**

Polivinilpirrolidona	250
Agente antivitrificante	1000
Sacarosa	60000
Phytigel®	5500
pH	5.7 – 5.8

3- Registro de heladas.

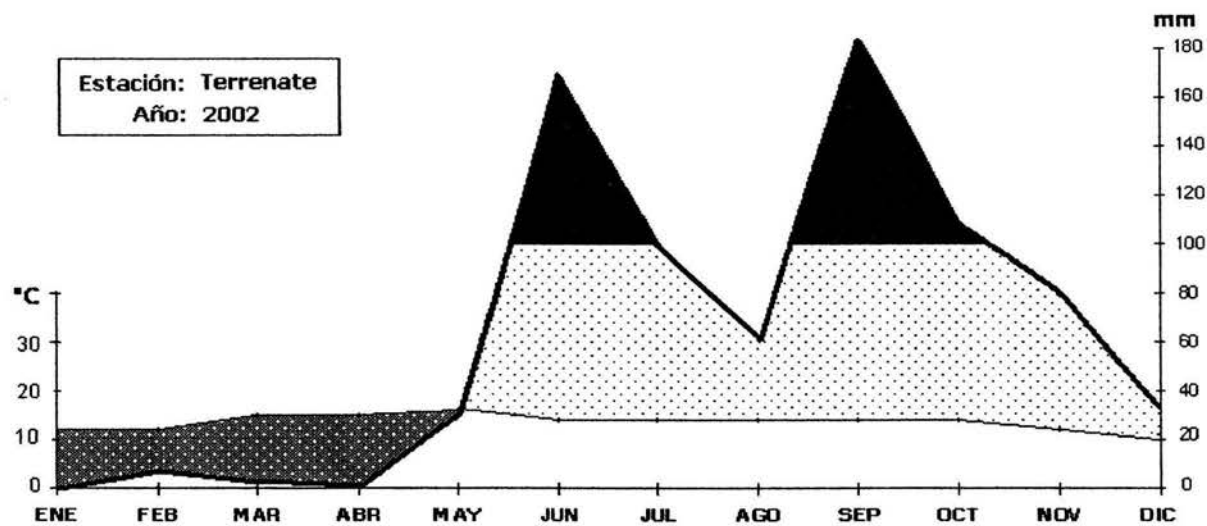
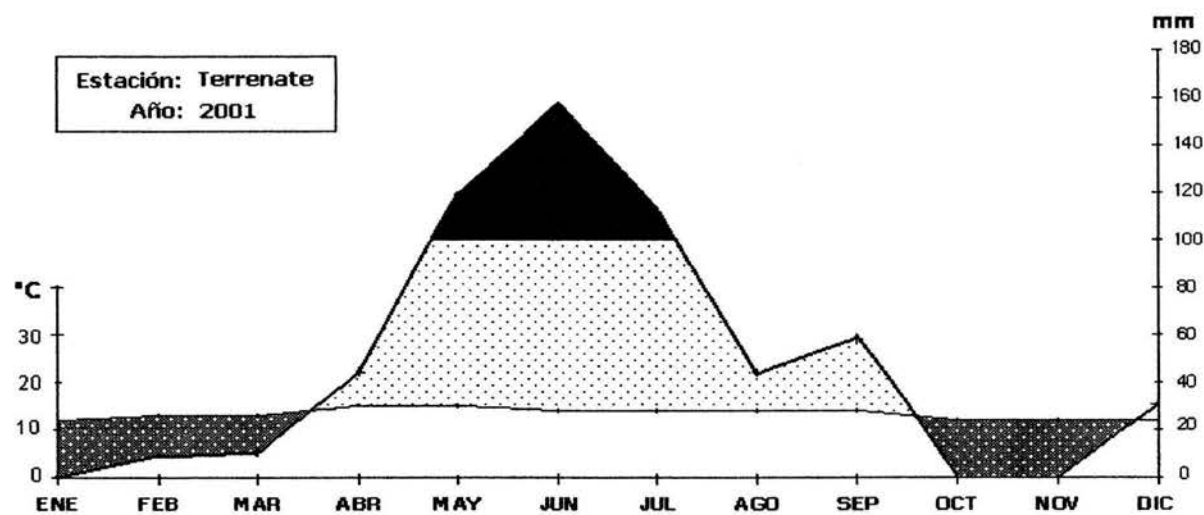
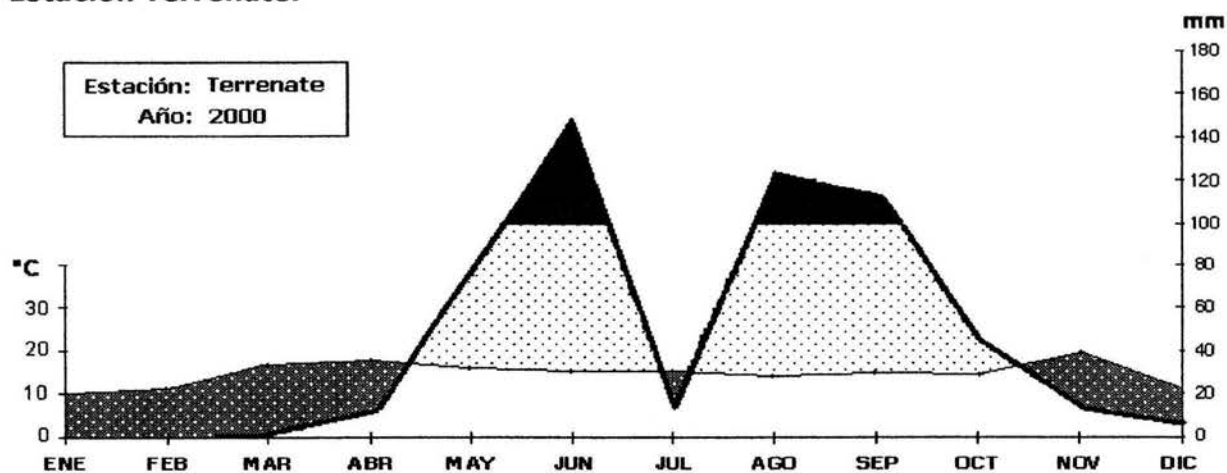
Estación El Epazote.

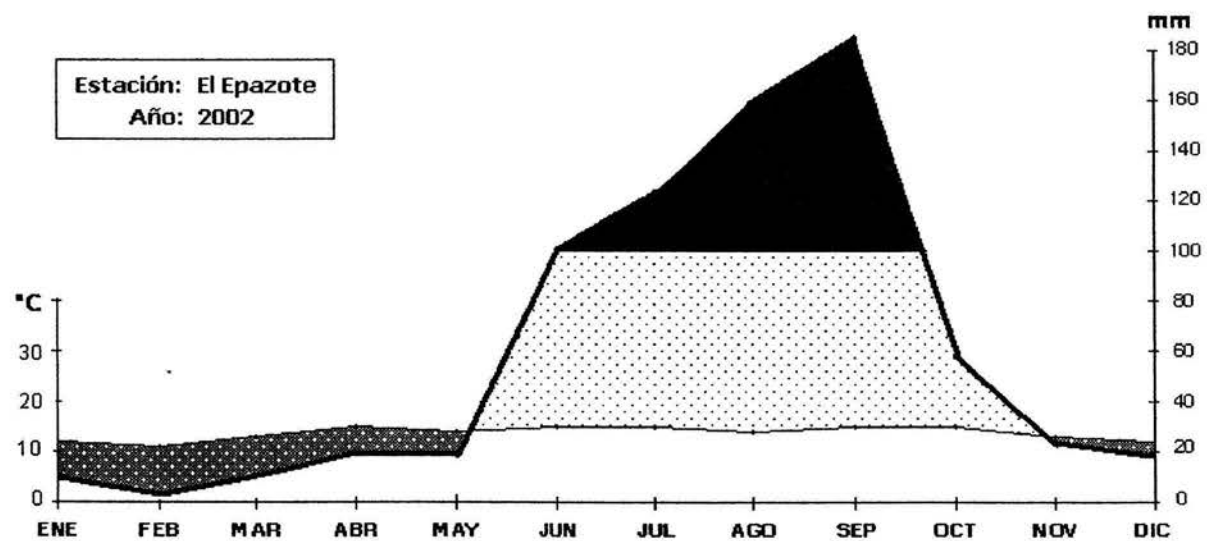
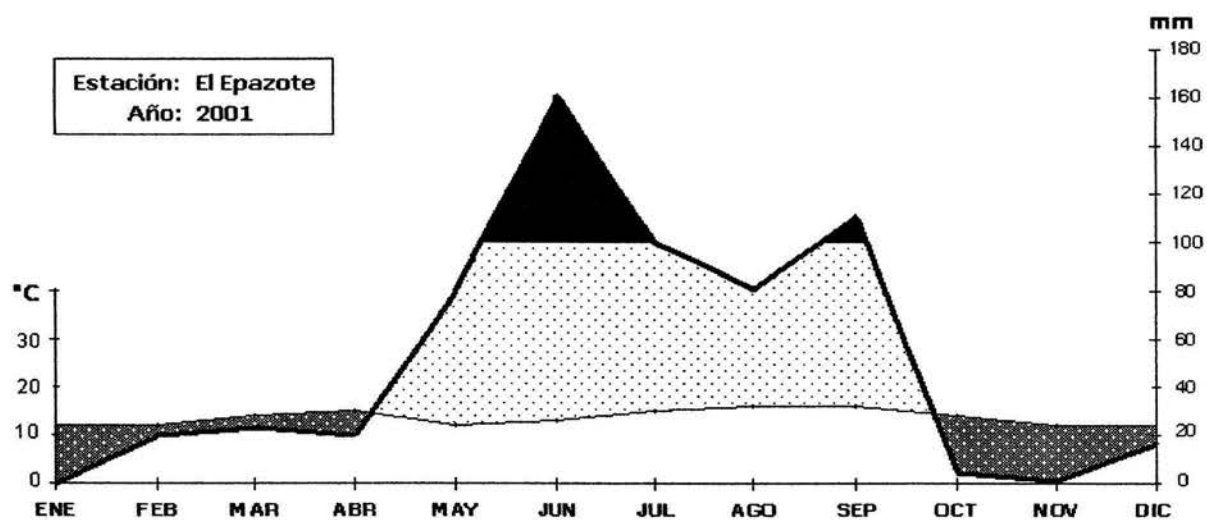
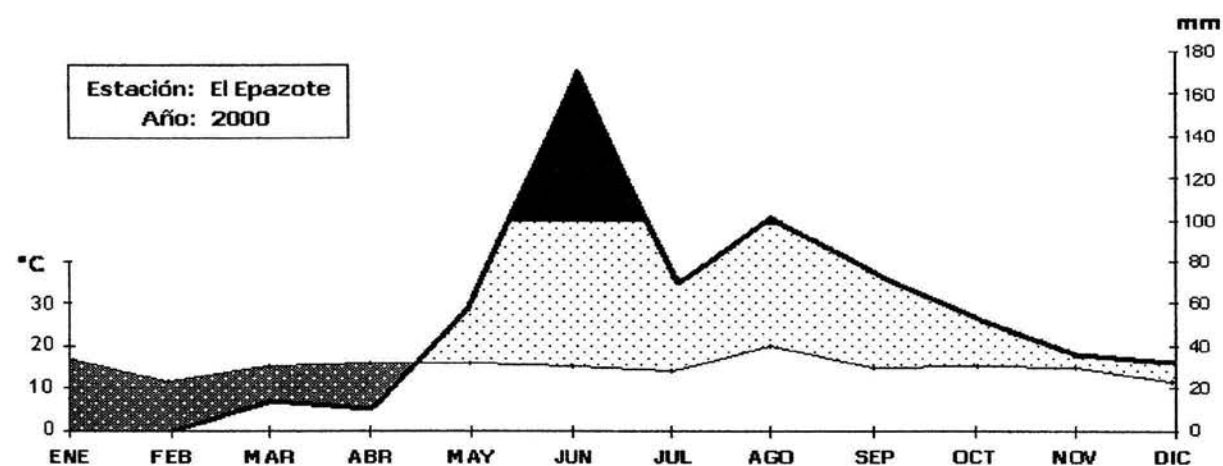


Estación Terrenate.

4- Gráficas de distribución de precipitación y temperatura

Estación Terrenate:



Estación: El Epazote.

13- BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Nil, M.M. 1987. Tissue culture of Douglas-fir and western North American conifers. *In*: Bonga, J.M. y D.J. 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 Gobierno del Estado de Tlaxcala, Jardín Botánico Tizatlán.
- Ahuja, M.R. 1993. (ed) **Micropropagation of woody plants**. Kluwer Academic Publishers.
- Allen, G.S. y J.N. Owens. 1972. The life history of Douglas-fir- For. **Serv. Environ. Can.** Ottawa, ON.
- Arteca, R.N. 1996. **Plant growth substances: principles an applications**. Chapman and Hall. Nueva York.
- Attree, S.M. y L.C. Fowke. 1991. Micropropagation through somatic emryogenesis in conifers. *In*: Bajaj, Y.P.S. (ed). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Vol. 17. High-tech and micropropagation. Springer-Verlag. Berlin.
- Attree, S.M. y L.C. Fowke. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 35: 1-35.
- Baños, T. 2002. Iniciaré la CGE acciones de rescate del pinabete. **El sol de Tlaxcala**. 4 de Diciembre. Local 13.
- Becwar, M.R.; R. Nagmani y S.R. Wann. 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus tadea*). **Can. J. For. Res.** 20:810-817.
- Binding, H. y G. Krumbiegel-Schroeren. 1984. Clonal Propagation: Shoot culture. *In*: Vasil, K. (ed). **Cell culture and somatic cell genetics in plants**. Vol. 1 Academic Press Inc.
- Bonga, J.M. y P. von Aderkas. 1992. **In vitro culture of trees**. Kluwer Academic Pub.
- Brown, D.C.W.; K. I. Finstad y E.M. Watson. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. *In*: Thorpe, T.A. (ed). **In vitro embyogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers.
- Budimir, S. y R. Vujiêié. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omirika* (Panêié) Purk. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 31:89-94.
- Burgess, J. 1985. **An introduction to plant cell development**. Cambridge University Press.
- Chávez, V.M. 1993. **Embriogénesis somática a partir de foliolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. robusta (Miq.) Dyer (*Zamiaceae*)**

- especie en peligro de extinción.** Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Chávez, V.M. y A.I. Rubluo. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. **In:** Linares, Edelmira; Patricia Dávila; Fernando Chiang; Robert Bye y Thomas S. Elias. **Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques.** Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Chávez, V.M.; R.E. Litz y K. Norstog. 1992 a. In vitro morphogenesis of *Ceratozomia Hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 30:93-98
- Chávez, V.M.; R.E. Litz y K. Norstog. 1992 b. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 30:99-105
- Chávez, V.M.; R.E. Litz y K. Norstog. 1992 c. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozomia mexicana* var. *robusta* (Miq) Dyer (Cycadales) In Vitro. **Cell. Dev. Biol.** 28P:59-63.
- Cheah, K.T. y T.Y. Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultures Douglas-fir cotyledons. **Amer. J. Bot.** 65(8): 845-849.
- Cheng, T. 1977. Recent advances in development of *in vitro* techniques for Douglas fir. **In:** 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.
- Cheng, T. y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir Plantlets through tissue culture. **Sci.** 198: 306-307
- Coulson, R.N. y J.A. Witter. 1980. **Entomología forestal, ecología y control.** Noriega editores. México.
- Dalal, M.A.; B.B. Sharma y M.S. Rao. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. **Scientia Hortic.** 51: 35-41.
- Davies, P.J. 1990. The plant hormones: Their nature, occurrence and functions. **In:** Davies, P.J. **Plant hormones end their role in plant growth and development.** Kluwer Academic Publishers. pp. 1-11.
- Debreczy, Z. y I. Rácz. 1995. New species and varieties of conifers from México. **Phytologia.** 78(4)217-243.
- Diario Oficial de la Federación (DOF).** 2001. Poder Ejecutivo, Secretaría de Desarrollo Social. México, D.F.
- Domínguez, F.A. 1994. **Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México.** Folleto Técnico No. 23 División Forestal. SAHR-INIFAP-CIRGC.

- Dunstan, D.I.; T.E. Tautorius y T.A. Thorpe. 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. **In:** Thorpe, T.A. (ed). **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers.
- Durzan, D.J. y P.K. Gupta. 1987. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension culture. **Plant Sci.** 52:229-235.
- Espinosa, J. 1979. PINACEAE **In:** Rzedowski y Rzedowski (comp.). **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. 1. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N., México, D.F.
- Farjon, A. 1990. **World checklist and bibliography of conifers**. Royal Botanical Gardens at Kew. Richmond, U.K.
- Fehér, A.; T.P. Pastenak y D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 74:201-228.
- Feirer, R.P. 1995. The Biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines and storage proteins. **In:** Mohan, Jain S.; Pramod K. Gupta y Ronald J. Newton (eds). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers.
- Filonova L.H.; P.V. Bozhkov y S. von Arnold. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **J. Exp. Bot.** 51 343:249-264.
- Franco, P.J.G. 1990. **Dinámica de la regeneración de *Pseudotsuga flahualti* Flous en el bosque de *Pseudotsuga-Pinus-Abies***. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". División de Agronomía. Saltillo, Coahuila, Méx.
- Galindo-Flores, G.L. 1996. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Vía organogénesis a partir de embriones maduros. **Memoria del III Congreso nacional de Biotecnología**. Chih., 14-18 de octubre. UACH-ANABAF. Chihuahua, Méx.
- Gamborg, O.L. y C.G. Phillips. 1995. **Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods**. Springer-Verlag. Berlin.
- García-Campusano, F.T.A. 1999. **Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous**. Tesis licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla. Tlax.
- García-Campusano, F.T.A. 2003. **Ontogenia de brotes adventicios obtenidos mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous**. Tesis maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- George, E.F. 1993. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The technology. 2da ed. Exegetics Limited. Basingstoke, U.K.
- George, E.F. y P.D. Sherrington 1984. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited. Basingstoke, U.K.
- Goldfarb, B. y J.B. Zaerr. 1989. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB) Franco). In: Basay y Ds (eds). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlag, Berlin. pp. 526-545.
- Guerra-De la Cruz, V. 2001. **Stand structure and dynamics of isolated *Pseudotsuga* forest in Southern North America**. Ph D thesis. Northern Arizona University.
- Gupta, P.K. y J.A. Grob. 1995. Somatic embryogenesis in conifers. In: Mohan, Jain S.; Pramod K. Gupta y Ronald J. Newton (eds). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers
- Gupta, P.K. y J.D. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertina*). **Plant cell Reports**. 4: 177-179.
- Hall, R.H. 1976. Hormonal mechanisms for differentiation in plant tissue culture. **In vitro**. 12. 3:216-224.
- Harry, I.S. y T.A. Thorpe. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of Jake pine. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 37:159-164.
- Hassing, B.E.; T.D. Davis y D.E. Riemenshneider. 1992. Reaching the controls of adventitious rooting. **Physiol. Plant.** 84: 310-317.
- Hedlin, A.F.; H.O. Yates III; David Cribián Tovar; Bernard H. Ebel; Thomas W. Koeber y Edward P. Merkel. 1980. **Cone and seed insects of north American conifers**.
- Hermann, R.K. y D.P. Lavender. 1999. *Pseudotsuga menziesii* (mirb) Franco.: *Pinaceae*. In: Russell, M.B. y B.H. Honkala (eds). **Silvies of North America 1: Conifers**. Agriculture Handbook 654. Vol.1 USDA Forest Services. Washington, D.C.
- Jäger, A.K. y J. van Staden. 1996. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyerianus* y *E. natalensis*. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 45:99-102.
- Joy IV, R.W. y T.A. Thorpe. 1999. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry y molecular biology. In: Woong-Young S. y S.S. Bhojwani. (eds) 1999. **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Kluwer Academic Publishers.
- Kong, L.; S.M. Attree; D.E. Evans; P. Binarova; E.C. Yeung y L.C. Fowke. 1999. Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology. In: Mohan, Jain S.; Pramod K. Gupta y Ronald J. Newton (eds). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers.

- Kozai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In*: Dever, P.C. and R.H. Zimmerman (eds.) **Micropropagation**. Kluwer Academic Publishers. pp. 447-469.
- Laukkanen H.; H. Häggman; S. Kontunen-Soppela y A. Hohtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiol. Plant.** 106:337-343.
- Laurain, D.; J.C. Chénieux y Tremouillaux-Guiller. 1996. somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 44:19-24
- Lelu, M.A.; K.K. Klimasewska; C. Jones; C. Ward; P. von Aderkas y P-J. Charest, 1993. **A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch**. Petawawa National Forestry Institute. Information report PI-X-111. Canada
- Li, P. y W.T. Adams. 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). **Can. J. For. Res.** 19:149-161.
- Lin, Y.; M.R. Wagner y L.J. Heidmann. 1991. *In vitro* formation buds by immature shoots of Ponderosa pine. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 26: 161:166.
- López-Curto, M.L.; J.M. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 1998. **Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas**. 1ª Ed. Facultad de Ciencias, UNAM.
- López-Escamilla, A.L. 2000. **Organogénesis *in vitro* y adquisición de la competencia morfogénica 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.
- Mapes, M.O. y J.B. Zaerr. 1981. The effect of the female gametophyte on the growth of cultures Douglas-fir embryos. **Ann. Bot.** 48:577-582.
- Mápula, L.R.; R. Bonilla y D.A. Rodríguez T. 1996. Germinación y crecimiento inicial de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en Chapingo, México. **Revista Chapingo. Ciencias Forestales** 5: 111-117.
- Mapula-Larreta, N.; J. López-Upton; J.J. Vargas-Hernández y A. Hernández-Livera. 2004. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. **In press**.
- Martínez, M. 1953. **Las Pináceas Mexicanas**. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F.
- Martínez-Palacios A.; P. Ortega-Larrocea; V.M. Chávez-Ávila; R. Bye-Boettler. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for it's conservation. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 74:135-142.
- Mauri, P.V. y J.A. Manzanera. 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex*) somatic embryos. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 74(3):229-235.

- Mazari, A. y E.L. Camm. 1993. Effect of cytokinins of plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of *Pinus ponderosa* Dougl. cotyledons cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 33:81-89.
- Méndez-Montiel, J.T. y F. Zavala-Chávez. 1996. Un procedimiento para la protección contra insectos de conos en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. **Revista Chapingo. Ciencias Forestales.** 1:119-124.
- Michaux-Ferriere, N.; H. Grout y M.P. Carron. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (euphorbiaceae). **American Journal of Botany.** 79(2): 174-180.
- Mohammed, G. y W.E. Vidaver. 1988. Root production and plant development in tissue-cultured conifers. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 14: 136-160.
- Monjarás, G.G. 2001. **Influencia de reguladores de crecimiento, sustratos y medios de cultivo en la inducción de plántulas completas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous.** Tesis de licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixt. Tlax.
- Monnier, M. 1995. Culture of zygotic embryos. **In:** Thorpe, T.A. (ed). **In vitro embryogenesis in plants.** Kluwer Academic Publishers.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 25: 135-166.
- Nagmani, R.; A.M. Diner; S. Garton y A.E. Zipf. 1995. Anatomical comparison of somatic embryogenesis and zygotic embryogeny in conifers. **In:** Mohan, J.S.; P.K. Gupta y R.J. Newton. (eds). **Somatic embryogenesis in woody plants.** Vol 1. Kluwer academic Publishers.
- Niembro, R.A. 1979. **Semillas forestales. Dpto. de bosques.** UACH. Chapingo, Mex.
- Ogita, S; H. Sasamoto; E.C. Yeung y T. A Thorpe. 2001. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant** 37: 269-274.
- Percy, R.E.; K. Klimaszewska y D.R. Cyr. 2000. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. **Can. J. For. Res.** 30:1867-1876.
- Pérez-Sánchez, M.A. 1996. **Producción y viabilidad de semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, en las localidades de Tlaxco y Terrenate. Tlaxcala.** Tesis de licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlax.
- Pierik, R.L.M. 1987. **In vitro culture of higher plants.** Martinus Nijhoff Publishers miembro del Kluwer Academic Publishers.

- Raemakers, K.; E. Jacobsen y R. Visser. 1999. Proliferative somatic embryogenesis in woody species. *In*: Mohan, Jain S.; Pramod K. Gupta y Ronald J. Newton (eds). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers.
- Raghavan V. y Sharma K.K. 1995. Zygotic embryogenesis en Gymnosperms and Angiosperms. . *In*: Thorpe, T.A. (ed). **In vitro embyogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers.
- Rao, P.S. y V.A. Bapata. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). *In*: Vasil, K. (ed). **Cell culture and somatic cell genetics in plants**. Vol. 1 Academic Press Inc.
- Raven P.H.; R.F. Evert; S.E. Eichhorn. 2000. **Biology of plants**. Worth Publishers, Inc. New York, USA.
- Reyes H., J.V.; J.J. Vargas-Hernández y J. López-Upton. 2003. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga*. Acta Botánica. **In press**.
- Ruzin, S.E. 1999. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford University Press. New York.
- Sánchez-Espinosa, C. 2001. **Comparacion de la respuesta morfogenetica in vitro de cuatro diferentes poblaciones de *Picea chihuahuana* Martinez, especie mexicana endémica en peligro de extinción**. Tesis Licenciatura (Biologo). Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autonoma de México.
- Sæbø A.; T. Krekling y M. Appelgren. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult** 41 :177-185.
- Stasolla, C. y E.C. Yeung. 2003. Recent advances in conifer somatic embriogénesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult**. 74:15-35.
- Taber R.P.; C. Zhang y W. Hu. 1998. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga mezesii*) somatic embryo development. **Can. J. Bot.** 76:863-871.
- Tautorus T.E.; L.C. Fowke y D.I. Dunstan. 1991. Somatic embriogénesis in conifers. **Can. Jour. Bot.** 69: 1873-1899.
- Thorpe, T.A. y Harry I.S. 1991. **Clonal propagation of conifers**. Plant tissue culture manual C:3 1-6. Kluwer Academic Publishers.
- Thorpe, T.A. y I.S. Harry y P.P. Kumar. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. *In*: Deberg, P.C. y R.H. Zimmerman (eds). **Micropropagation**. Kluwer Academic Publishers. pp. 311-336.
- Thorpe, T.A. y K.R. Patel. 1984. Clonal propagation: Adventitious buds. *In*: Vasil, I.K. (ed). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants**, Vol 1 (pp 49-60) Academic press, New York.
- Vargas-Hernández, J.J. 1982. Aplicación del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. **Ciencia Forestal**. 39(7): 44-63.

- Villalobos, V.M.; T.A. Thorpe y E.C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. **Ciencia y Desarrollo**. 51(9): 43-59.
- von Arnold, S.; I. Sabala; P. Bozhkov; J. Dyachok y L. Filonova. 2002. Development pathways of somatic embriogénesis. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 69:233-249.
- Walter, H. 1979. **Vegetation of the earth and ecological systems of the geobiosphere**. Spring - Verlag. New York.
- Williams, E.G. y G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.** 57:443-462.
- Williams, J.A. 2000. Biogeography of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). San Francisco State University Department of Geography.
- Yañez, L.E. 1991. Análisis de la producción de semilla de *Pseudotsuga macrolepsi* Flous en una población natural de la sierra de pachuca, Hidalgo. Tesis maestría. División de ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Yeung, E.C. 1995. Structural developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed). **In vitro embyogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers.
- Yeung, E.C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems – some practical comments. **In vitro Cell. Dev. Biol.** 35:137-143.
- Zavala-Chávez, F. y J.T. Méndez-Montiel. 1996. Factores que afectan la producción de semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en el Estado de Hidalgo, México. **Act. Bot. Mex.** 36: 1-13.

PÁGINAS WEB

www.forestry.ubc.ca

www.inegi.gob.mx

www.lectura.ilce.edu.mx

www.mek.iif.hu/porta/szint/termesz/biologia/fenyok/html/nyitva/duglasz.htm

www.semarnat.gob.mx



Este trabajo fue impreso a doble cara para evitar el gasto innecesario de papel que se acostumbra en la impresión de tesis, pretendiendo contribuir de esta forma con un pequeñísimo granito, tal vez insignificante, a reducir el fuerte impacto que están sufriendo los bosques para la elaboración de más y más papel y frenar la desaparición de especies forestales tales como *Pseudotsuga*.