



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE  
EMBRIONES CIGOTICOS DE  
*Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS  
(CESALPINIACEAE)**

**TESIS QUE PARA  
OBTENER EL TITULO  
DE B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ELBERETH RAMSE CHAIRES ESPINOSA**

**Director de Tesis:  
M. en C. Ernesto Aguirre León**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Méx. Junio, 2009**





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.

**DEDICATORIA**

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS ABUELOS

---

---

## AGRADECIMIENTOS

ESTA TESIS ES LA CULMINACION DE UNA CARRERA UNIVERSITARIA QUE A BASE DE MUCHO ESFUERZO HA LLEGADO A SU CONCLUSION, ALGO CON LO QUE SOÑABA DESDE HACE MUCHO TIEMPO Y HOY SE HA MATERIALIZADO, POR LO QUE QUIERO AGRADECER A TODOS AQUELLOS A QUIENES ME HAN APOYADO DURANTE ESTE TIEMPO.

QUIERO AGRADECER EN PRIMER LUGAR A MIS PADRES GUADALUPE Y RODOLFO Y A MIS HERMANOS ALDEBARAN Y SHAKTY, QUIENES ME FORMARON, EDUCARON Y DIERON IDENTIDAD COMO PERSONA, QUIENES JAMAS DEJARON DE CREER EN MI Y ME DIERON SU APOYO EN TODO MOMENTO, EN ESPECIAL DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LOS DOCTORES CESAR FLORES Y SILVIA AGUILAR, ASI COMO A LAS MAESTRAS JOSEFINA VAZQUEZ Y MARIA HELENA HUIDOBRO POR EL TIEMPO DEDICADO A LA REVISION DE ESTA TESIS.

A ERNESTO AGUIRRE LEON POR SUS ENSEÑANZAS, SU PACIENCIA Y TODO EL APOYO QUE ME HA BRINDADO DURANTE TODOS ESTOS AÑOS, Y QUIEN SE HA CONVERTIDO EN UNA PERSONA MUY APRECIADA. GRACIAS MAESTRO.

A MIS AMIGOS LOS BUITRES CARLOS, RAUL, ALEXIS, BETO (MORENO) LOLO, Y DANIEL, QUIENES HAN SIDO POR MUCHOS AÑOS MIS MEJORES AMIGOS, CON QUIENES APRENDI Y COMPARTI UNA GRAN CANTIDAD DE EXPERIENCIAS.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA CARRERA OMAR, ERIK (PELON), JORGE, LUCERO, NADYA, SONIA, MARIBEL (TELE), DEY, NAYELLI, POCHO, VICTOR, MARU (HERMANA) POR SU AMISTAD Y APOYO Y ENSEÑARME EL VALOR DEL ESFUERZO Y EL TRABAJO EN EQUIPO.

A MIS AMIGOS JESSICA, ERIK (PANDA) Y DANTE POR SEGUIR CONSERVANDO Y ACRECENTANDO NUESTRA AMISTAD.

A MARY, POR SER UNA GRAN AMIGA Y MOTIVADORA, A QUIEN DEBO ESTE TRABAJO EN BUENA MEDIDA. GRACIAS.

A LIZ, CUYO AMOR, RESPETO Y CONFIANZA EN MI ME HA DADO LAS FUERZAS NECESARIAS PARA CONTINUAR Y NO DEJARME RENDIR. GRACIAS POR EXIGIRME, APOYARME Y POR AMARME. ¡¡TE AMO!!

## INDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	5
ANTECEDENTES.....	17
JUSTIFICACION.....	19
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
DESARROLLO DE PLÁNTULAS.....	32
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS.....	43
ANEXO.....	54

## RESUMEN

Las zonas áridas de México cuentan con una gran biodiversidad y un alto grado de endemismos de plantas que representan un importante número de recursos naturales empleados por el humano. Desafortunadamente, estos ambientes se encuentran sometidos a una presión cada vez mayor, conduciendo a una acelerada degradación y pérdida de diversidad biológica. Es por ello que es necesario emprender acciones de conservación con un aprovechamiento racional de los recursos. En este sentido, las especies multipropósito como algunas leguminosas juegan un papel crucial. Una de estas especies es *Parkinsonia praecox*, que puede ser aprovechada como especie forrajera, obtención leña, para la producción de miel y producción de goma brea, entre otros usos. Además, es una especie pionera con gran potencial para la restauración de suelos erosionados y sirve como nodriza para el desarrollo de otras plantas. Es, en consecuencia, necesario desarrollar métodos para su propagación masiva, por lo que actualmente se prueban varias vías para conseguirla incluyendo la micropropagación o cultivo de tejidos vegetales. Dentro de las técnicas empleadas en este campo el cultivo de embriones es una alternativa interesante puesto que, al tratarse de una estructura joven, es más sensible a la acción de reguladores de crecimiento, pudiéndose obtener brotes múltiples e inclusive embriones somáticos. El objetivo de este trabajo fue el de desarrollar un método de propagación *in vitro* de *Parkinsonia praecox* a partir de embriones cigóticos. Para ello, se probaron seis combinaciones de ANA y BA, evaluando su efecto sobre la regeneración, el crecimiento y el desarrollo de las plántulas a partir de embriones cigóticos. Los resultados obtenidos indican que la combinación de ANA y BA en las concentraciones 2.22  $\mu\text{M}$  BA, 0.26  $\mu\text{M}$  ANA; 2.22  $\mu\text{M}$  BA, 0.56  $\mu\text{M}$  ANA; 4.44  $\mu\text{M}$  BA, 0.26  $\mu\text{M}$  ANA y 4.44  $\mu\text{M}$  BA, 0.26  $\mu\text{M}$  ANA inducen callo friable con capacidad regenerativa, aunque falta desarrollar un medio que promueva organogénesis a partir de estas estructuras. Por su parte, el empleo de BA en concentraciones de 2.22 y 4.44  $\mu\text{M}$  inhibió la elongación de la raíz primaria, la formación de raíces laterales, pero promovió el desarrollo de pelos radiculares y el engrosamiento de las ramas en el brote. Por su parte, el empleo de ANA sin BA tuvo un efecto contrario, promoviendo la elongación de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y disminuyendo la cantidad de pelos radiculares. El patrón proteico de las plántulas obtenidas a partir de embriones cigóticos no reveló cambios en la expresión de proteínas relacionados con los cambios morfológicos y anatómicos ni en la formación de callo.

## INTRODUCCION

Los ecosistemas de las zonas áridas y semiáridas (regiones donde la precipitación pluvial media oscila entre los 350 y 600 mm anuales) del país constituyen cerca del 50% del territorio nacional y albergan aproximadamente 6000 especies vegetales con un gran número de endemismos, siendo los lugares que muestran mayor diversidad de especies de plantas en el país. Estas características representan una importante cantidad de recursos naturales empleados por habitantes de estas regiones y un gran potencial para la obtención de materias primas para la industria (Losano, 1995).

Cabe señalar que los ecosistemas áridos y semiáridos se encuentran sometidos a una gran presión ocasionada por el cambio del uso de suelo a sistemas agrícolas de temporal, con la incidencia de incendios, extracción de leña, depredación y sobrepastoreo (Montaño y Monroy, 2000). Aunado a lo anterior, estos son ecosistemas especialmente sensibles y tienen una baja capacidad de recuperación a las alteraciones tanto naturales como antropogénicas. Es por ello que resulta necesario emprender acciones de conservación y restauración en ellos (Montaño y Monroy, 2000).

Afortunadamente muchas de las plantas nativas de estas áreas son de carácter multiuso y si se manejan adecuadamente pueden resolver varios de los problemas existentes. Estas plantas se encuentran bien adaptadas a las condiciones de aridez y consumen menos agua que muchos de los cultivos introducidos. Además, mitigan los procesos de desertificación a través de la fijación y protección de suelo, también mejoran las condiciones microclimáticas, haciéndolas más favorables para la agricultura sostenible (Montaño y Monroy, 2000), tal es el caso de *Parkinsonia praecox* que es una especie pionera o colonizadora, con gran capacidad para adaptarse a condiciones de aridez (Alesso, 2003), es por ello que *P. praecox* tiene un gran potencial para la restauración de suelos erosionados de zonas áridas y semiáridas (Burkart y Carter, 1976; Martínez Carretero, 1986; Páez y Marco, 2000, Montaño y Monroy, 2000). Se emplea especialmente como fuente de leña y tiene un alto potencial en la industria por la secreción de una sustancia gomosa empleada alimenticia. Es por ello que su propagación

## REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

---

masiva genera interés y actualmente se prueban varias vías para conseguirla incluyendo la micropropagación o cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es un término utilizado para referirse a toda una serie de metodologías empleadas para propagar plantas a partir de pequeñas porciones de diferentes órganos de la planta en medios de cultivo en condiciones asépticas. Las porciones de las plantas empleadas en el cultivo *in vitro* reciben el nombre de explantes, y estos pueden ser órganos, tejidos o bien células aisladas de una planta. Debido a sus características, el cultivo *in vitro* de plantas tiene muchas aplicaciones prácticas como la propagación masiva de clones, producción de plantas de lento crecimiento y difícil manejo, desarrollo de nuevos cultivares, propagación vegetativa de híbridos estériles, producción de plantas libres de patógenos, como virus, bacterias, hongos y bancos de germoplasma, entre otras. Es por ello que el cultivo *in vitro* ha sido empleado en un gran número de especies con fines tanto comerciales e industriales como de investigación y conservación.

Por todo lo antes mencionado, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una de las aplicaciones biotecnológicas más importantes en el campo de la conservación, ya que las plantas pueden multiplicarse masivamente utilizando explantes vegetativos y/o sexuales. Es por tanto, una alternativa viable para la propagación de plantas que son útiles en el manejo y restauración de ecosistemas áridos como *P. praecox*.

---

## CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE DE ESTUDIO

**Sinonimias:** *Caesalpinia praecox* Ruiz Lopez & Pavon, *Cercidium goldmanii* Rose, *Cercidium plurifoliolatum* M. Micheli, *Cercidium praecox* (Ruiz Lopez & Pavon) Harms *Cercidium spinosum* Tul. *Cercidium unijugum* Rose, *Cercidium viride*, (Karsten) Karsten.

**Nombres comunes:** Palo verde, palo verde de Sonora, palo brea, retama, espino verde, cajinga, cagüinga, chañar brea, brea, chañar, manteco, cahuinga.



**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

**UBICACION TAXONOMICA**

*Parkinsonia praecox* pertenece a la subfamilia CAESALPINACEAE, una de las tres subfamilias en que se divide la familia FABACEAE. Esta subfamilia consta de 150 géneros y aproximadamente 2,200 a 2,700 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de África y América. La subfamilia se divide en 5 tribus, siendo la tribu Cesalpinieae en donde se ubica el género *Parkinsonia*, el cual reúne a aproximadamente 10 especies de las cuales seis se encuentran en América y cuatro en África; en México se encuentran cuatro especies: *P. aculeata*, *P. florida*, *P. microphylla* y *P. praecox*.

**Reino Plantae**

Subreino **Tracheobionta**

División **Magnoliophyta**

Clase **Magnoliopsida**

Subclase **Rosidae**

Orden **Fabales**

Familia **Fabaceae (Leguminosae)**

Subfamilia **Cesalpinieae**

Tribu **Caesalpinieae**

Género ***Parkinsonia***

**DESCRIPCION BOTANICA**

Árbol o arbusto espinoso de 3 a 8 m de altura, y diámetro a la altura del pecho (d.a.p.) de hasta 30 cm; tronco corto, tortuoso y de corteza lisa de color verde claro, ramificado muy cerca de la base, con espinas de 0.5 a 1 cm de largo. Las ramas son tortuosas y de color verde, ascendentes, con espinas generalmente en cada nudo, casi siempre solitarias, de hasta 2 cm. de longitud; copa muy abierta. Las ramas jóvenes son de color amarillo claro y lisas, con una espina terminal de 5 a 15 mm de largo en la inserción de cada hoja o glomérulo de hojas, mientras que las ramas más viejas son moreno oscuras con numerosas lenticelas suberificadas casi negras.



**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

El tronco y las ramas principales del árbol presentan la particularidad de exudar una sustancia gomosa a través de heridas accidentales o provocadas (Alesso *et al*, 2003). El árbol segrega esta sustancia para cicatrizar las lesiones que se producen en la corteza (Losano, 1995). Esta goma proviene de las células del parénquima que rodea a los vasos del xilema secundario y provoca la oclusión total o parcial de su lumen, todo ello ocasionado por algún traumatismo (Losano *et al*, 2000).

Las hojas son compuestas, bipinnadas, pinadas usualmente 1 par, de 2 a 3 cm de largo, divergentes; con 3 a 12 pares de folíolos, oblongos, ápice redondeado, de margen entero con 3 a 6 mm de largo; racimos 1 a 3 por nudo, de 1 a 1.5 cm de largo, rodeadas por varias estipulas pequeñas, vilosas, de 2 a 1.5 mm de largo, ovadas, acuminadas, pubescentes y persistentes; las hojas son de color verde pálido en el haz y en el envés y se disponen en espiral aglomeradas en las ramas viejas.



Las flores se disponen en racimos muy cortos, aglomerados en el nacimiento de las hojas, sostenidos por las espinas, con pedicelos de 5 a 15 mm de largo; flores zigomorfas de 1 a 6 cm, perfumadas, de cáliz verde, estrecho y prolongado hacia la base, de 8 mm de largo, cortamente tubular en la base, con 5 lóbulos oblongo - lanceolados, valvados; corola compuesta por 5 pétalos pálidos o profundamente amarillos, con pequeñas manchas rojas, desiguales, el más superior de 9 a 11 mm de largo y 6 a 8 mm de ancho, ovados u orbiculares, glabros; androceo compuesto por 10 estambres desiguales, de hasta 9 mm de largo, con filamentos verdes o amarillos, hinchados y vilosos en la base, las anteras pardas y glabras; el ovario es supero, unilocular, multiovular, alargado, glabro, con un estilo esbelto del mismo largo que los estambres (Fig. 1).

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

El fruto es una vaina aplanada papirácea de hasta 10 cm de largo y 1 cm de ancho, con finas nervaduras superficiales, contiene varias semillas oblongas, pequeñas, muy delgadas, de color pardo grisáceo de aproximadamente 7 mm de largo (Burkart, 1962, Abundiz – Bonilla *et al.*, 2004).

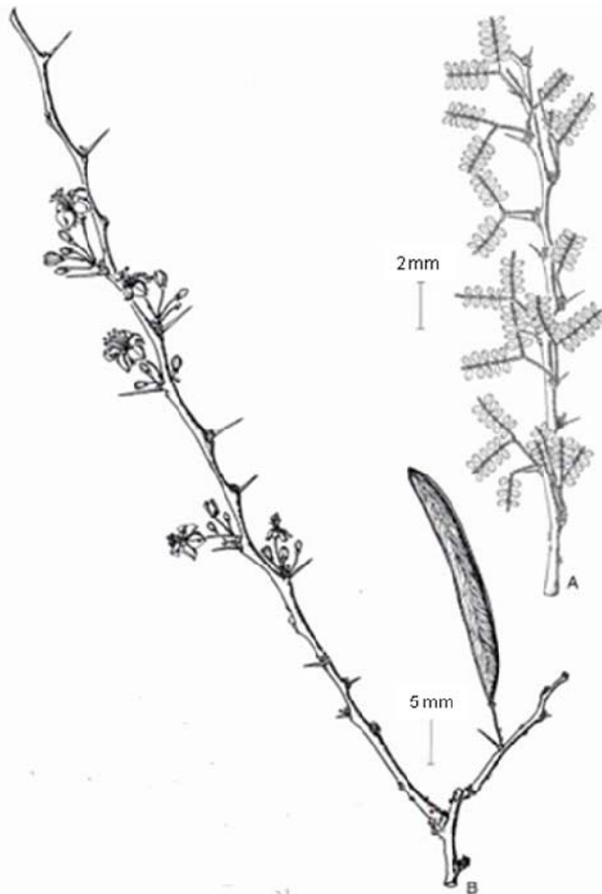


Figura 1. Dibujo de hojas, flores y fruto de *Parkinsonia praecox* tomado de Pennington y Sarukhán (2005).

## FENOLOGIA

La especie es caducifolia, durante la mayor parte del año permanece sin hojas. Su periodo de floración es entre los meses de marzo y septiembre, pero en la región de Zapotitlán se observa una sincronía en su floración, que ocurre durante los meses de febrero y marzo (Olvera, 2006).

## ECOLOGIA Y DISTRIBUCION

En México se distribuye principalmente en la vertiente del Pacífico, desde Baja California Sur y Sonora, la Cuenca del Balsas, la Cuenca Alta del Papaloapan, la región de Cuicatlán, Oaxaca, la región del istmo de Tehuantepec, la zona semiárida de Tehuacan Puebla, en la vertiente del Golfo y en la depresión central de Chiapas (Fig. 2).

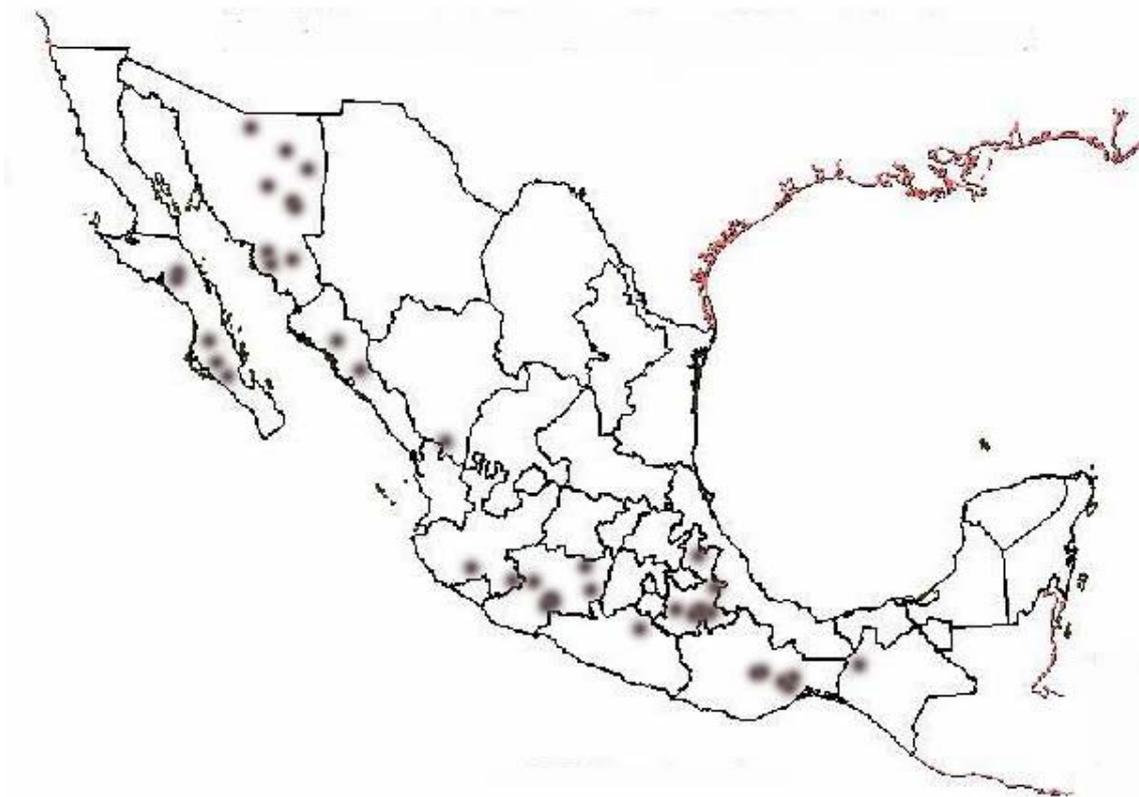


Figura 2. Mapa de distribución de *Parkinsonia praecox* basado en Pennington y Sarukhán (2005).

## REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

---

Es parte importante de la selva baja caducifolia y subperennifolia, asociada principalmente a *Prosopis laevigata*, numerosas especies de *Bursera*, *Haematoxylum brasiletto* y *Ziziphus* sp. Asimismo, forma parte de la vegetación del bosque espinoso asociado con *Acacia cochliacantha*, *A. farnesiana*, *A. macilenta*, *Guaiacum coulteri*, *Mimosa arenosa*, *M. rosei*, *Apoplanesia paniculata*, *Ziziphus amole*, *Haematoxylum brasiletto* y *Podopterus mexicanus* (Pennington y Sarukhán, 2005.).

### IMPORTANCIA ECOLOGICA

Se le considera una planta nodriza, ya que debajo de la cobertura de esta especie y gracias a la sombra que produce, es común encontrar individuos juveniles o plántulas de diferentes especies de cactáceas, agaváceas, pequeños arbustos y plantas anuales. Su permanencia evita la erosión hídrica y eólica, manteniendo la fertilidad del suelo, por lo que tiene un papel crucial para la preservación, conservación y restauración de ecosistemas áridos (Bucher y Huszar, 1999; Montaña y Monroy, 2000).

### IMPORTANCIA SOCIOECONOMICA

En la comunidad de Zapotitlán Salinas, *Parkinsonia praecox*, es usada como hospedera de la larva comestible de un insecto conocida localmente como Cuchamá (*Paradirphia fomosa*: LEPIDOPTERA: SATURNIDAE) que se alimenta del tallo y de las hojas de éste árbol. La etapa larvaria ocurre durante los meses junio a agosto (inclusive hasta octubre), y es un platillo muy valorado en la región (Arias, 2002; Olvera, 2006).

En ocasiones, los habitantes de la región de Zapotitlán Salinas la emplean como forofito para el cultivo de pitahaya (*Hylocereus undatus*, CACTACEAE), ya que el palo verde protege a estos cultivos, brindando sombra y un ambiente relativamente fresco y húmedo, propicio para su crecimiento (Olvera, 2006).

---

El palo verde, junto con otras especies de las zonas áridas, tienen papel crucial para las poblaciones humanas, puesto que la leña y el carbón que se obtiene de estas suele ser la única fuente energética empleada por los habitantes. Asimismo, su madera en ocasiones es empleada como material de construcción y para la fabricación de herramientas. De igual forma, es empleado como cerca viva y sus hojas y flores sirven como forraje para el pequeño ganado (Arias, 2002). Por otro lado, *Parkinsonia praecox* se ha reportado como una especie de mediana importancia para la producción de miel (Chifa *et al.*, 2000).

Adicionalmente, *P. praecox* exuda una resina polisacárida e hidrocoloidal llamada goma brea, que tiene propiedades fisicoquímicas similares a la goma arábica. Esta sustancia es fácilmente soluble en agua, produciendo una solución homogénea, viscosa y clara. Está constituida por un polisacárido ácido formado por arabinosa, xilosa y ácido glucurónico, (De Pinto *et al.*, 1993). Para su aprovechamiento, se realizan incisiones o cortes en forma de "V" o bien heridas horizontales con hacha o machete para cosechar la goma antes que cicatrice la herida (Alesso, 2003). La goma tiene un gran potencial industrial, ya que puede usarse como sustituto de la goma arábica en la industria de la alimentación, siendo empleada para la fabricación de emulsiones, panes, lácteos congelados, películas comestibles, así como en otras industrias como en la textil, cosmética, farmacéutica e inclusive minera. Su extracción y comercialización se realiza de manera importante en la región de El Chaco en Argentina.

## **PROPAGACION**

La gran cantidad de beneficios económicos, ecológicos y sociales obtenidos a partir de especie hacen crucial la necesidad de implementar métodos adecuados para su propagación y obtención de plantas saludables. La propagación tradicional de esta especie ha sido a través de semilla, sin embargo, la mayoría de las semillas producidas por *P. praecox* son atacadas por la larva del insecto *Mimosestes amicus*, un coleóptero de la familia BRUCHIDAE que devora gran parte de la semilla. La propagación vegetativa, ya sea por estacas, esquejes o acodos aéreos no es común, ni se tiene documentada. Ante esta situación la micropropagación puede ser una alternativa al método convencional de propagación con el objetivo de incrementar la tasa de multiplicación.

## **MICROPROPAGACION**

La micropropagación (cultivo *in vitro* de tejidos) es un conjunto de métodos en los cuales se toman fragmentos (explantes) de tejidos, órganos o bien células aisladas de plantas y se cultivan bajo condiciones asépticas en un medio de cultivo con un ambiente controlado. Los cultivos tienen un desarrollo acelerado, con lo que se puede producir una gran cantidad de plantas en un período corto y en un espacio relativamente pequeño. Una de las ventajas del empleo de estas técnicas es la conservación de materiales sin mucha alteración, de una manera relativamente fácil y rápida, además se elimina el problema de la latencia y se reduce el estado juvenil. También es una medida para la perpetuación de clones que no producen semillas o bien que aún haciéndolo, no resultan viables.

El cultivo de células y tejidos ha jugado un papel importante en los estudios fisiológicos, pero también ha cobrado una gran importancia en el campo de la industria y la conservación. El éxito en la micropropagación depende principalmente de tres aspectos fundamentales: el medio de cultivo, las condiciones de cultivo y el explante utilizado. Es, en consecuencia, una tecnología aplicable a la propagación de especies amenazadas y de interés socioeconómico.

Dependiendo del explante utilizado, el cultivo se puede clasificar como indiferenciado (callos) o cultivo de estructuras diferenciadas (organizadas) tales como meristemos, brotes, nodos, raíces aisladas, hojas, semillas y embriones, estos últimos han demostrado tener mayores ventajas, ya que al ser estructuras jóvenes responden mejor a los reguladores de crecimiento y las condiciones de cultivo.

## **CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES**

---

El cultivo de embriones se puede definir como el aislamiento y cultivo en condiciones de asepsia de embriones cigóticos, maduros o inmaduros, con el objetivo de obtener una planta viable (Raghavan, 2003). El éxito del cultivo de embriones depende del genotipo del embrión, el grado de desarrollo, medio de cultivo y condiciones de cultivo (luz, temperatura y envase). El cultivo *in vitro* de embriones tiene aplicaciones prácticas como lo son el rompimiento de dormancia de la semilla, la aceleración del ciclo de vida, la prevención del aborto de embriones de frutos de rápida maduración, rescate de embriones de híbridos interespecíficos y cruzas entre diploides tetraploides, la propagación *in vitro* de gramíneas y coníferas, el rescate de embriones para la producción de plantas haploides, así como pruebas de germinación y de viabilidad, intercambio de material biológico a través de fronteras internacionales y propagación masiva de plantas (Mukul y Sumita, 2004; Chang y Yang, 1996, cita), además al ser un tejido joven es una fuente potencial para tejidos embriogénicos (Mikula *et al.*, 2004) .

---

## ANTECEDENTES

La micropropagación ha sido empleada en diversas especies de leguminosas siguiendo distintas técnicas y explantes. Mittal *et al.* (1989) lograron obtener brotes múltiples a partir de yemas axilares extraídas de plántulas cultivadas *in vitro* de *Acacia auriculiformis*. Jones *et al.* (1990) utilizaron nudos entrenudos y pecíolos para la propagación *in vitro* de varias especies del género *Acacia* produciendo alrededor de 12 brotes por explante. Caro *et al.* (2002) realizaron con éxito la micropropagación de *Prosopis chilensis* a partir de explantes de plantas jóvenes y maduras. Marinucci y colaboradores (2004) trabajaron la propagación *in vitro* de cotiledones inmaduros de leguminosas leñosas nativas de Argentina, obteniendo, entre otros resultados, la regeneración de brotes y raíces adventicias de *Parkinsonia aculeata*.

En el caso de *Parkinsonia praecox*, Labrada (2005) evaluó el efecto de combinaciones de reguladores de crecimiento en la formación de brotes a partir de diversos explantes, encontrando que el epicótilo, los nudos cotiledonarios y los cotiledones fueron los explantes con mejores respuestas organogénicas.

Sobre el cultivo de embriones se han realizado numerosas aportaciones que datan desde mediados del siglo XIX (Raghavan, 2003). Mata (2001) logró la regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros de *Picea chihuahuana*, siendo el tratamiento con cinetina el más efectivo en la formación de brotes múltiples; sin embargo, el enraizamiento no se llevó a cabo de manera satisfactoria. Mehta y colaboradores (2000) llevaron a cabo el cultivo de ejes embrionarios de *Tamarindus indica* empleando los reguladores ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BA) a diferentes concentraciones, y observaron que en presencia de BA se restringía la diferenciación meristemática radicular, además de que en varios de los tratamientos con ANA y BA se observaron protuberancias en la superficie de los ejes embrionarios. Xueqin (2002a) realizó el cultivo de embriones aislados de *Pinus radiata* observando que ninguno de los reguladores de crecimiento probados tuvo un efecto benéfico para el desarrollo de los embriones, e inclusive algunos mostraron un efecto negativo, únicamente el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) tuvo un aparente resultado positivo al estimular la germinación. En semillas germinadas de *Tamarindus indica*, Mehta y colaboradores (2005) consiguieron brotes múltiples en la región del nudo cotiledonario con la aplicación de TDZ.

## JUSTIFICACION

El cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una de las aplicaciones biotecnológicas más importantes en el campo de la conservación, ya que las plantas pueden multiplicarse masivamente. A pesar de existir una gran cantidad de trabajos de micropropagación de leguminosas, las aportaciones para *Parkinsonia praecox* son escasas, lo mismo que las referidas al cultivo de embriones con fines de propagación masiva en leguminosas. Considerando la amplia gama de posibilidades que ese procedimiento ofrece, este trabajo tiene la finalidad de emplear el cultivo de embriones *in vitro* para la propagación de *Parkinsonia praecox*.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

**OBJETIVOS**

**GENERAL:**

- Desarrollar un método de regeneración *in vitro* de plantas a partir de embriones cigóticos de *Parkinsonia praecox*.

**PARTICULARES:**

- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento ANA y BA sobre la germinación de embriones cigóticos de *Parkinsonia praecox*.
- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento ANA y BA en el crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas a partir de embriones cigóticos de *Parkinsonia praecox*.
- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento ANA y BA en la inducción de callo y brotes múltiples a partir de embriones cigóticos de *Parkinsonia praecox*.
- Observar los cambios anatómicos en la raíz de provocados por los reguladores de crecimiento en plántulas de *Parkinsonia praecox*.
- Obtener los patrones proteicos como una medida del desarrollo de las plántulas de *Parkinsonia praecox* obtenidas a partir de embriones cigóticos.

## MATERIAL Y METODOS

### COLECTA DE SEMILLAS

Para el experimento se colectaron semillas de *Parkinsonia praecox* del Jardín Botánico de Zapotitlán Salinas, así como de la región cercana al pueblo de Santa María Amazac que se encuentra próximo a la ciudad de Tehuacan, Puebla, en los meses de abril y mayo de 2007. Esta zona posee un relieve irregular, pudiéndose observar cerros, declives, lomeríos, barrancas y terrazas aluviales. El clima de la región corresponde a un BSo hw (i,) que es seco semicálido con una temperatura media anual de 21° C, una precipitación media anual de 400 a 500 mm. El tipo de vegetación dominante es el matorral xerófilo. Las diversas asociaciones vegetales encontradas en el Valle de Tehuacán - Cuicatlán se pueden observar en el trabajo de Valiente – Banuet y colaboradores (2000).

### EXTRACCIÓN Y CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES

Las semillas fueron extraídas de las vainas, descartando aquellas que mostraban daños visibles. Posteriormente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 30 min. a una temperatura de 40°C. Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se colocaron en imbibición durante 24 hrs. en una caja petri con 5 ml de agua destilada esterilizada y papel absorbente. Previo a la extracción de los embriones, las semillas se desinfectaron nuevamente con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 5 min. en agitación constante, para posteriormente ser enjuagadas nuevamente con agua destilada estéril. La extracción de los embriones se realizó retirando la cubierta seminal, para poder separar los cotiledones del embrión, esto en una campana de flujo laminar. Los embriones así extraídos fueron inoculados en frascos de vidrio (7.5 x 4 x 3.5 cm.) con 10 ml de medio de cultivo. Se utilizó el medio Murashige y Skoog (1962) (5524 SIGMA) a la mitad de su concentración, adicionado con vitaminas.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Se emplearon los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en las siguientes concentraciones empleadas en los trabajos de diversos autores (Frantini y Ruiz, 2002; Huang *et al.*, 1994; Mittal *et al.*, 1989, Quoirin *et al.*, 1998).

Tratamientos	Concentración de reguladores de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )	
	BA	ANA
1	0.0	0.54
2	0.0	0.26
3	2.22	0.54
4	2.22	0.26
5	4.44	0.54
6	4.44	0.26
7 (control)	0.0	0.0

Tabla 1. Combinaciones de ANA y BA aplicadas a embriones cigóticos de *P. praecox*.

## VARIABLES DE RESPUESTA

### GERMINACIÓN DE EMBRIONES

Se registró la germinación en todos los tratamientos de cultivo considerándose germinados una vez que la radícula se extiende e inicia la formación del brote.

### CRECIMIENTO DE LA PLANTULA

El crecimiento de las plántulas fue determinado por la medición de la longitud de la raíz y de brotes con ayuda de un vernier digital, así como el peso fresco de cada uno de los tratamientos al final de la fase experimental en una balanza semianalítica.

### DESARROLLO DE LA PLÁNTULA

Para determinar el desarrollo, se registraron las características morfológicas de las plántulas, como apariencia del tallo y raíz, número de folíolos, formación y friabilidad de callo, número de raíces laterales y número de brotes.

### **PATRON PROTEICO**

Para determinar el contenido de proteínas totales se tomó entre 400 y 500 mg de tejido fresco homogenizado y se maceraron en el doble de volumen (m/v) de un buffer de Tris – HCl 50 mM pH 7.3, el homogenizado se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos, todo este procedimiento se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. A continuación se recuperó el sobrenadante con el cual se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford, mediante una curva de albúmina de suero bovino de 10 a 50 µg (Bradford, 1976). Posteriormente las muestras fueron desnaturalizadas a 80°C durante 3 minutos con el buffer de carga (Tri – HCl. 0.125 M pH 6.8, con 4% de SDS, Glicerol 20%, 2 – meraptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12.5 %, utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS) AL 10%. Los extractos de cada tratamiento se sembraron a una concentración de 10 µg de proteína en cada poza, usando un sistema de MINIPROTEAN III (Bio – Rad). El revelado de las proteínas se llevó a cabo en reactivo de Bradford con sulfato de amonio al 16%(Laemmli, 1970).

### **CORTES HISTOLOGICOS**

Se realizó un estudio anatómico de los cambios observados en las raíces de *Parkinsonia praecox*. Para ello, plántulas de cuatro semanas crecidas en los diferentes tratamientos se fijaron en FAA (5 ml de formaldehído, 5 ml de ácido acético glacial y 90 ml de alcohol etílico al 70%) durante 48 horas. Posteriormente se lavaron en agua corriente y se realizaron cortes de secciones transversales a mano alzada con una navaja de afeitar de la parte media de las raíces (Aguilar-Rodríguez, 1998; Sandoval, 2005). Se montaron en gelatina glicerizada coloreada con safranina. Las descripciones se llevaron a cabo siguiendo la terminología de Fahn (1985). Las características de los tejidos se

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

describieron empleando un analizador de imágenes NIS-Elements BR 2.33. (Nikon Corporation, 1991-2006) y se obtuvieron fotografías con ayuda de una cámara digital.

**ANALISIS ESTADISTICO**

Para el análisis de las variables de porcentaje de germinación, longitud, peso fresco, número de folíolos, número de raíces laterales y número de brotes se empleó un análisis de varianza con un  $\alpha=0.05$ , en las pruebas en las cuales se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba de LSD. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con la ayuda del programa estadístico SIGMASTAT® 3.5.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### GERMINACION DE EMBRIONES

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados en este trabajo no afectaron el porcentaje de germinación ni el tiempo de la misma. El máximo porcentaje de germinación (97%) se alcanzó entre el séptimo y noveno día de cultivo (Figura 3).

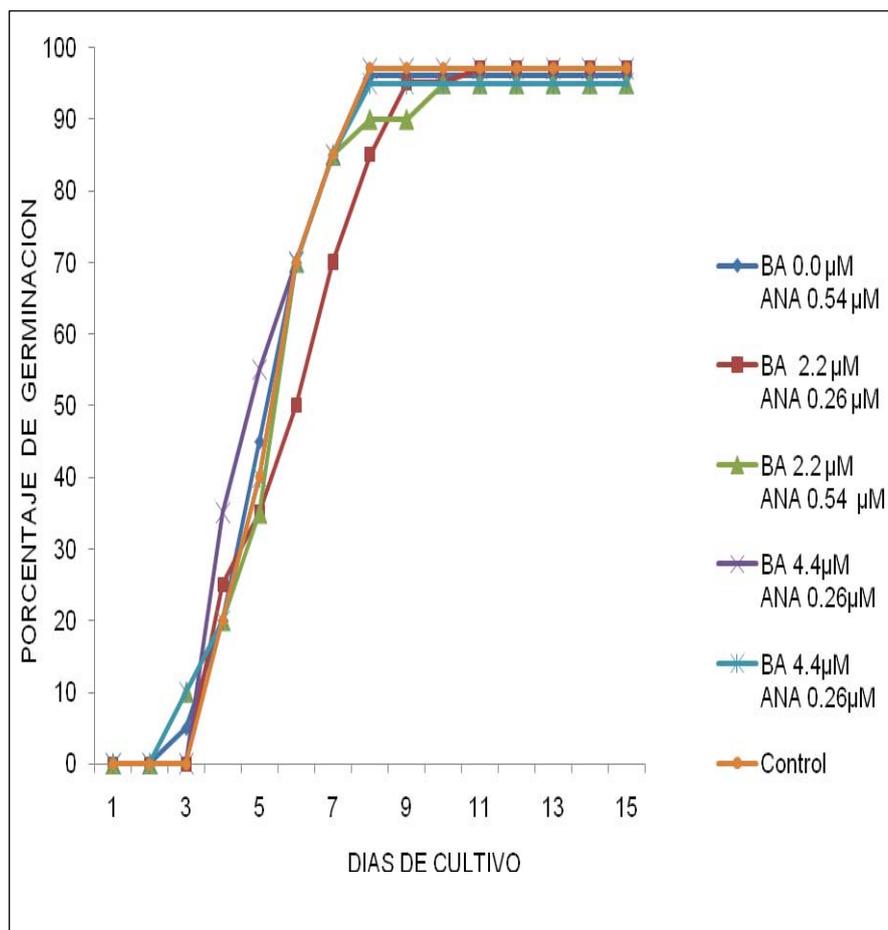


Figura 3. Porcentaje de germinación de los embriones de *P. praecox* en los distintos tratamientos con BA y ANA.

El porcentaje de germinación de los embriones cultivados en los distintos medios de cultivo no varió significativamente entre los tratamientos y el control, lo que sugiere que los reguladores de crecimiento empleados no afectan esta variable (Figura 4). En este

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

trabajo se ha demostrado que los embriones aislados de *P. praecox* no requieren de la adición de reguladores de crecimiento para su germinación, aunque la aplicación exógena tampoco la afecta de forma negativa.

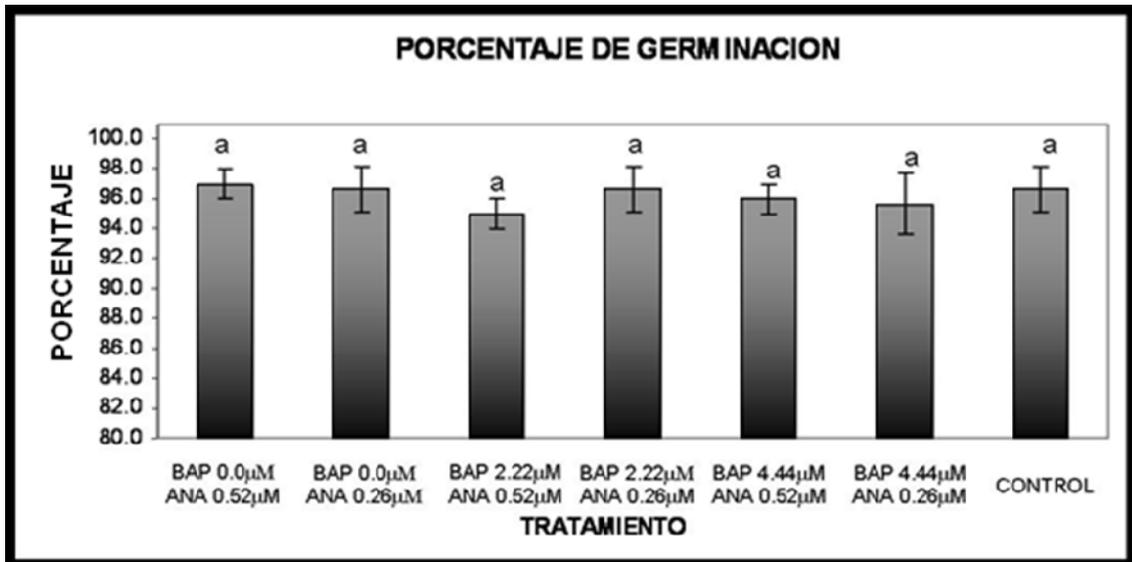


Figura 4. Porcentaje de germinación de los embriones de *P. praecox* en los distintos tratamientos con BA y ANA después de 15 días tratamiento.

Estudios realizados recientemente, han demostrado que tanto las auxinas como las citocininas participan activamente en el metabolismo durante la germinación, en casi todas las fases desde la imbibición hasta la emergencia de la radícula (Stirk *et al.*, 2005, Chiwocha *et al.*, 2005). Sin embargo, la aplicación exógena de citocininas y auxinas tiene efectos variables en la germinación de distintas especies. En *Pinus radiata* (Xueqin *et al.*, 2002a), así como en varias especies del género *Phaseolus* (Malik y Saxena 1992a), los tratamientos con auxinas y citocininas tuvieron un efecto nulo sobre la germinación de embriones aislados. Por otro lado, Nikolic y colaboradores (2006) encontraron que varias citocininas aumentan el tiempo y porcentaje de germinación en semillas de *Lotus corniculatus*, especialmente TDZ, zeatina y BA. En maíz ha sido observada la estimulación de la germinación por la aplicación de auxinas y citocininas, sin embargo, pareciera ser que el efecto estimulador de estos dos fitoreguladores está más relacionado con la promoción de la división celular que con el proceso germinativo propiamente dicho (Vázquez – Ramos *et al.* 2008). Estos trabajos indican que los efectos estimuladores de auxinas y citocininas exógenas sobre la germinación son especie – dependientes.

## CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS

El crecimiento fue determinado por el aumento en talla y en peso fresco de las plántulas cultivadas *in vitro*. Como se observa en la Figura 5, el tratamiento BA 4.44  $\mu\text{M}$ , ANA 0.26  $\mu\text{M}$  produjo diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos con reguladores de crecimiento, aunque no se encontró no se observaron diferencias con el control. El aumento en peso puede deberse a una mayor incorporación de agua en los tejidos, ya que no se observa un aumento en la talla de las plantas de este tratamiento (Figura 6).

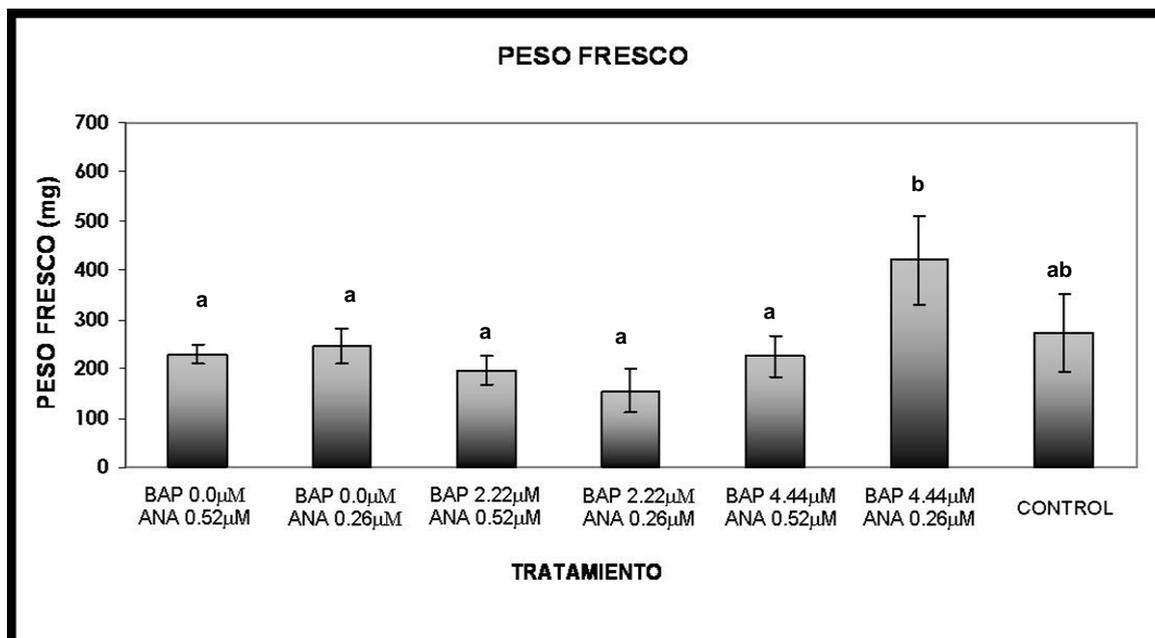


Figura 5. Peso fresco de plántulas de *Parkinsonia praecox* en los diversos tratamiento con ANA y BA cultivadas *in vitro*. Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de ANOVA con un  $\alpha=0.05$ . Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

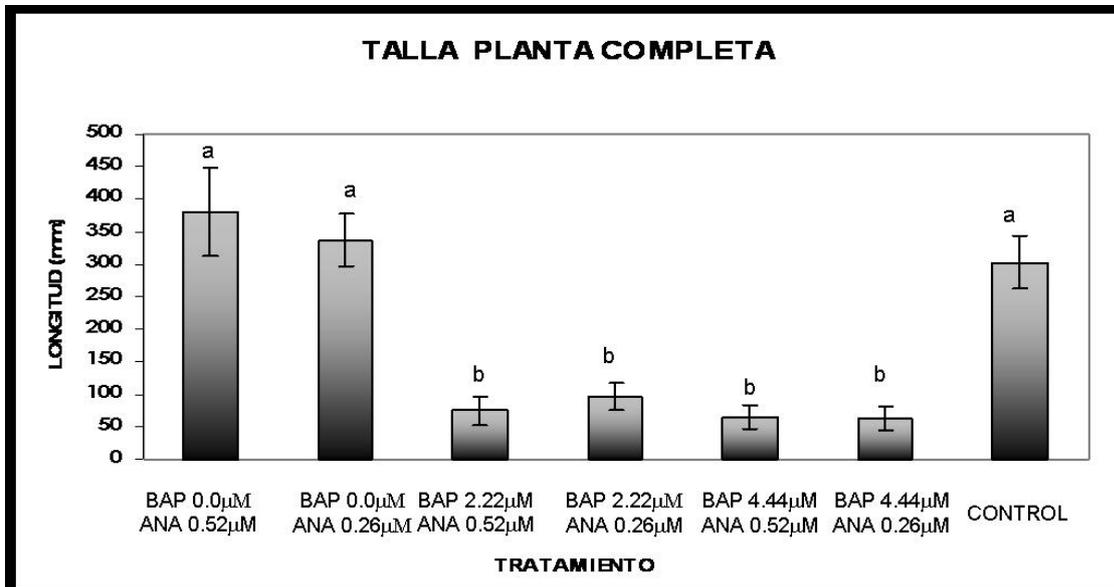


Figura 6. Talla de las plántulas completas de *Parkinsonia praecox* cultivadas *in vitro* con distintas concentraciones de ANA y BA. Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de ANOVA con un  $\alpha=0.05$ . Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

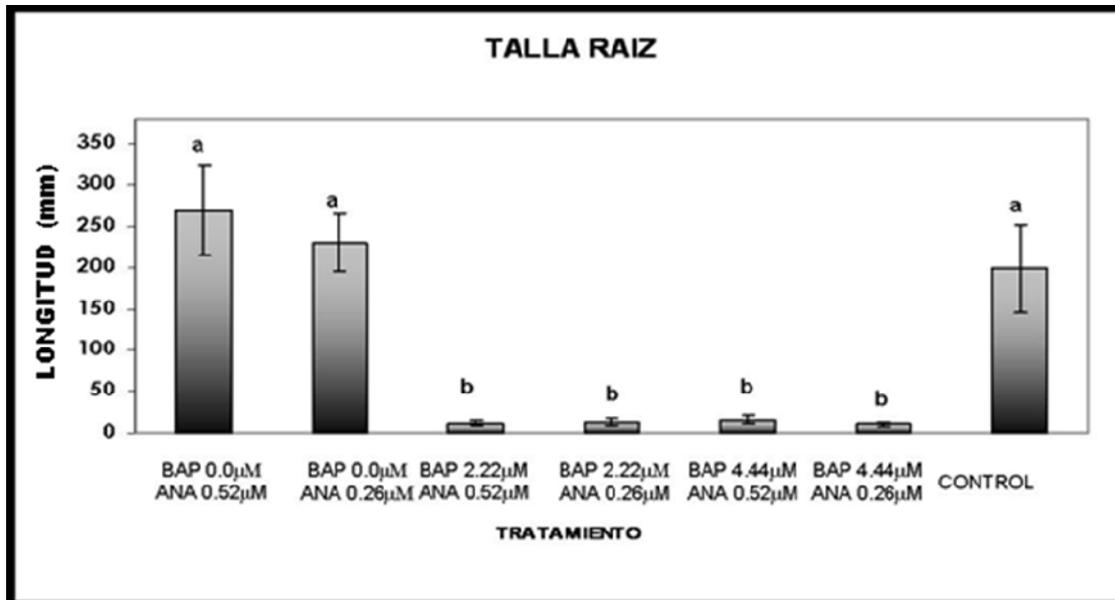


Figura 7. Talla de la raíz de las plántulas de *Parkinsonia praecox* cultivadas *in vitro* con distintas concentraciones de ANA y BA. Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de ANOVA con un  $\alpha=0.05$ . Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

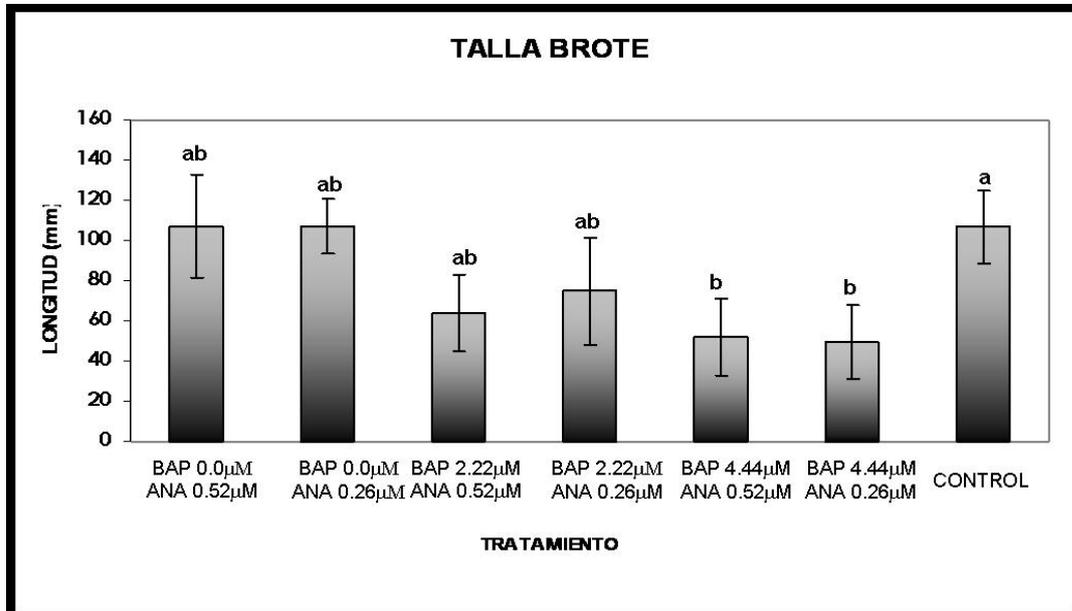


Figura 8. Talla del brote de las plántulas de *Parkinsonia praecox* cultivadas *in vitro* con distintas concentraciones de ANA y BA. Los resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de ANOVA con un  $\alpha=0.05$ . Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Por otro, lado la talla de las plántulas también fue modificada por el tratamiento con reguladores, puesto que, como se observa en la Figura 6, todos los tratamientos con BA mostraron tallas sustancialmente menores a la talla de los tratamientos exclusivamente con ANA, los cuales mostraron una talla similar a la del control. Estas diferencias se deben principalmente al efecto de BA sobre el crecimiento de la raíz, ya que ésta fue la más afectada por el uso de este regulador como se muestra en la Figura 7, en la que el crecimiento de la raíz fue inhibido casi por completo, mientras que los tratamientos BA 4.44  $\mu\text{M}$ , ANA 0.26  $\mu\text{M}$  y BA 4.44  $\mu\text{M}$  ANA 0.52  $\mu\text{M}$  mostraron diferencias significativas únicamente con el control (Figura 7), por lo que la aplicación de BA tuvo un efecto marcadamente inhibitorio del crecimiento de la raíz, independientemente de su concentración.

La elongación de brote y raíz de *P. praecox* se vio influenciada por la aplicación de BA. En los medios que carecían de este regulador de crecimiento, la elongación fue ligeramente superior al control pero sin observarse diferencias significativas. Sin embargo, al aplicar

## REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

---

BA en las diferentes concentraciones y combinaciones con ANA, se pudo observar una reducción significativa en la talla de la plántula. El efecto negativo de las citocininas sobre la elongación de brotes y raíces ha sido reportado previamente en varios trabajos (Quoirin, *et al* 1998). Esta inhibición de la elongación se dio tanto en raíz como en brote, aunque las respuestas fueron distintas. En el brote, los efectos sobre el crecimiento fueron dependientes de la concentración de BA, ya que en la menor concentración empleada, la disminución en la talla con respecto al control no fue significativa, pero en la concentración mayor (BA 4.44  $\mu$ M) los efectos si fueron significativos. La inhibición del crecimiento de la raíz fue independiente de la concentración de BA. Estos resultados concuerdan con los de Nikolic (2006) quien, incluso usando concentraciones muy bajas de BA, observó que el crecimiento de la raíz se detuvo. La acción inhibitoria de las citocininas sobre la elongación de la raíz es un hecho bien documentado (Xueqin, 2002a; Frantini y Ruiz, 2002).

La inhibición de la elongación de la planta por parte de las citocininas puede deberse a un efecto sobre las células del meristemo apical, inhibiendo la dominancia apical y deteniendo la división celular en el mismo. Adicionalmente, la inhibición de la elongación también depende de las citocininas empleadas. Las citocininas con mayor efecto inhibitorio, son TDZ y BA, mientras que otras como 2iP, cinetina y zeatina muestran efectos dependientes de la concentración (Frantini y Ruiz, 2002).

Las auxinas tienen la función de estimular la elongación de las raíces y brotes (Taiz y Zeiger, 2002). Se ha observado que la aplicación exógena de estos reguladores tiene un efecto significativo sobre la dinámica del crecimiento y desarrollo de las plantas, aunque estas diferencias anatómicas y morfológicas dependen del tipo de auxina empleada y de su concentración. (Kolarova, 2004), en general se ha visto que desde concentraciones muy bajas a regulares se estimula la elongación, mientras que a grandes concentraciones se ve inhibida (Kolarova, 2004). En este sentido Slankis (1950), observó que concentraciones de 0.5 mg/l de ANA y AIA, inhiben el crecimiento de raíces de pino en cultivo líquido, mientras que en concentraciones de 0.05 mg/l promueven la elongación, Sacher (1956), también demostró el efecto inhibitorio de ANA (0.5 mg/l) sobre el crecimiento de la raíz de embriones de pino. La inhibición del crecimiento de la raíz por altas concentraciones de auxinas puede deberse a que las auxinas están asociadas a la estimulación de la producción de etileno, por lo que una concentración alta de auxinas

---

induce una sobreproducción de este regulador con la consecuente inhibición del crecimiento (Taiz y Zeiger, 2002). En el caso de *P. praecox* la aplicación de ANA a estas dos concentraciones (0.26  $\mu\text{M}$  y 0.52  $\mu\text{M}$ ) no tuvo un efecto significativo en el crecimiento normal de la planta.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los de Nikolic (2006) quien incluso usando concentraciones muy bajas de BA observó que el crecimiento de la raíz se detuvo. La acción inhibitoria de las citocininas sobre la elongación de la raíz es un hecho bien documentado (Xueqin, 2002a; Frantini y Ruiz, 2002). Esta puede deberse a un efecto sobre las células del meristemo apical, inhibiendo la dominancia y deteniendo la división celular en el mismo. La inhibición de la elongación también depende de la citocinina empleada, ya que en un estudio comparativo de distintas citocininas sobre *Lens culinaris*, TDZ y BA tuvieron un mayor efecto inhibitorio, mientras que otras como 2iP, cinetina y zeatina muestran efectos dependientes de la concentración (Frantini y Ruiz, 2002).

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

**DESARROLLO DE PLÁNTULAS**

Se observaron diferencias en cuanto al desarrollo de las plántulas de *Parkinsonia praecox* en los distintos tratamientos. En los tratamientos con ANA sin BA se observó una mayor formación de raíces laterales, siendo superior a las formadas en el control (Tabla 2). En el resto de los tratamientos esta formación inhibe por completo y la raíz principal modifica completamente su apariencia, dando lugar a raíces cortas y engrosadas, de textura rugosa y de color pardo. Estas raíces posteriormente formaron dos tipos de callo, el primero de apariencia verde claro y/o amarillento friable y un segundo de color pardo. Estos callos fueron subcultivados posteriormente en medio de cultivo sin reguladores, pero no produjeron ninguna respuesta favorable y después de 30 días de cultivo se oxidaron y murieron.

En cuanto al desarrollo de la parte aérea, esta también se vió modificada por el empleo de BA. En estos tratamientos la talla del vástago fue menor a la del control. Por otro lado no se observaron diferencias significativas en el número de folíolos (Tabla 2).

Tabla 2. Respuestas morfogénicas de las plántulas de *P. praecox* cultivadas *in vitro* con distintas concentraciones de ANA y BA.

Los

Tratamiento	Número de raíces laterales	Número de folíolos	Calogénesis
BA 0.0 $\mu\text{M}$ ANA 0.26 $\mu\text{M}$	17.71a	32.00a	-
BA 0.0 $\mu\text{M}$ ANA 0.54 $\mu\text{M}$	16a	30.5a	-
BA 2.2 $\mu\text{M}$ ANA 0.26 $\mu\text{M}$	NA	25.6a	+
BA 2.2 $\mu\text{M}$ ANA 0.54 $\mu\text{M}$	NA	30.5 a	+
BA 4.4 $\mu\text{M}$ ANA 0.26 $\mu\text{M}$	NA	28.2a	+
BA 4.4 $\mu\text{M}$ ANA 0.56 $\mu\text{M}$	NA	28.5a	+
CONTROL	10.86b	37.71a	-

resultados obtenidos fueron analizados con una prueba de ANOVA con un  $\alpha=0.05$ . Las letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. NA= no formación de raíces laterales.

---

A partir de la quinta semana de cultivo se observó la caída de folíolos en todos los tratamientos, la cual puede ser atribuida a condiciones estresantes en el ambiente de cultivo provocado posiblemente por la luminosidad, la temperatura o bien la humedad. Con el transcurso de las semanas la pérdida se hizo más grave, desprendiéndose la totalidad de los folíolos de las plántulas. El subcultivo de las plántulas ralentizaba esta pérdida, pero no la inhibía totalmente. Esta caída no fue reversible en condiciones *in vitro*, pero al ser transplantadas a suelo y en condiciones de aclimatación se logró recuperar algunas de las plántulas.

La formación de raíces laterales juega un rol crucial en el desarrollo de la planta, ya que permite la construcción del sistema radicular ramificado. El proceso de formación de raíces laterales consiste en dos pasos principales: la reactivación del ciclo celular, en el periciclo y el establecimiento de un nuevo meristemo. (Laskowski *et al.*, 1995; Himanen *et al.*, 2002). Las raíces laterales son derivadas postembrionariamente de las raíces existentes, cuya formación inicia con las divisiones anticlinales en el periciclo adyacentes a dos polos protoxilemáticos (Waisel *et al.*, 2002), es por esto que la activación del ciclo celular está conectado con la iniciación de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997).

La formación de raíces laterales está determinada por la concentración de macronutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo (Osmont *et al.*, 2007). Sin embargo, estos factores abióticos regulan la aparición de raíces laterales a través de hormonas vegetales (Osmont *et al.*, 2007). De este modo, la iniciación, emergencia y elongación de raíces laterales es dependiente de auxinas (Beeckman *et al.*, 2001; Laskowski *et al.*, 1995; Casimiro *et al.*, 2001; Casimiro *et al.*, 2003; Himanen *et al.*, 2002). Esto se ha comprobado, ya que en un gran número de mutantes de *Arabidopsis* defectuosas en la biosíntesis, transporte o señalización de auxinas se altera la formación de raíces laterales (Boerjan, *et al.*, 1995; Celenza, *et al.*, 1995; Hobbieand y Estelle, 1995; King *et al.*, 1995; Marchant, *et al.*, 2002; Ruegger, *et al.*, 1998). En otros trabajos la aplicación exógena de ácido indol-butírico (IBA) y otras auxinas promueve la formación de raíces laterales (Laskowski *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 2006,) y en caso de *P. praecox* se observa el mismo patrón.

## REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

---

Además de las auxinas, otras hormonas como el etileno y las citocininas modulan la formación de raíces laterales. Las citocininas, en contraste con las auxinas, inhiben la aparición de raíces laterales (Waisel, 2002), aunque el efecto o inhibidor nuevamente está en relación con la citocinina usada y su concentración. La zeatina, por ejemplo, aplicada exógenamente en bajas concentraciones, estimula la producción de raíces en raíces de chícharo, pero en altas concentraciones es un fuerte inhibidor (Torrey, 1962). En lechuga, la formación espontánea de raíces laterales también se ve inhibida por la aplicación de citocininas exógenas (Maclsaac, 1989, 2002). Van Staden y Ntingane (1996), inhibiendo tanto la iniciación como la emergencia de raíces laterales. En mutantes de *Arabidopsis* con disminución en los niveles de citocininas, existe un incremento en las ramificación del sistema radicular (Osmont *et al.*, 2007). En dicotiledóneas, las raíces laterales se originan a partir las células del periciclo, que experimentan divisiones tanto anticlinales como periclinales. En raíces aisladas de chícharo, Webster y Radin (1972) (citados por Waisel, 2002) encontraron que el comportamiento del periciclo depende de la proporción de auxinas y citocininas. Cuando solamente se aplicaron citocininas, el periciclo mostró un aspecto multiseriado, mientras que, con la sola aplicación de auxinas se promovió la formación de raíces laterales, mientras que la aplicación de ambas formó un cambium verdadero. Estudios acerca de los receptores de estas hormonas en las células del periciclo podría dilucidar varias de las incógnitas en cuanto a la formación de raíces laterales.



## ORGANOGENESIS Y FORMACIÓN DE CALLO

En el presente trabajo se encontró que la aplicación de BA induce callo friable con capacidad para la producción masiva de plantas. A pesar de lo anterior, los callos generados no produjeron ningún tipo de estructura diferenciada, una de las razones por las que ello no ocurrió pudo ser la edad del embrión puesto que ésta influye considerablemente en su habilidad regenerativa. En el presente trabajo no se produjeron brotes múltiples, sin embargo, las ramificaciones del epicótilo fueron más engrosadas de lo normal, por lo que éstas podrían extirparse y subcultivarse con la posibilidad de regenerar plantas completas.

La proporción auxina-citocinina es importante para la morfogénesis en el sistema de cultivo. Se ha observado que en una proporción mayor de auxina con respecto a las citocinina se induce embriogénesis, callogénesis y formación de raíces. Por el contrario, una dosis mayor de citocinina con respecto a auxina conlleva a la proliferación axilar y brotes múltiples (Razda, 2003). Asimismo, la concentración de estas dos fitohormonas influye sobre el comportamiento de los cultivos, a mayores concentraciones se induce la formación de callo, mientras que bajas concentraciones favorecen la formación de brotes (Razda, 2003). Algunos trabajos indican que en otras especies de leguminosas el comportamiento es similar, aunque la mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo con explantes distintos a embriones cigóticos, es decir, hipocótilos, raíces, cotiledones, nudos cotiledonarios y hojas.

En *Acacia maernsii* (Huang *et al.*, 1994), BA mostró influencia significativa en la *formación* de brotes. BA es un regulador de crecimiento que posee la característica de inducir la citocinesis principalmente en regiones meristemáticas y ayuda a romper la dominancia apical presente en la mayoría de las plantas (Salisbury y Ross, 1992). En relación con ello, la respuesta de *P. praecox* fue formar callo, en distintas partes del embrión en desarrollo con distinto aspecto. Las auxinas y citocininas inducen la formación de callo en el embrión debido a que es una estructura joven sensible a su aplicación, a partir de este callo se puede inducir la generación de brotes o bien la producción de embriones somáticos, por lo que su utilización en el medio de cultivo con fines de producción masiva es viable. Se ha reportado que los callos de origen embrionario poseen una alta

---

capacidad regenerativa comparada con aquellos derivados de órganos maduros como hojas tallos y raíces (Razda, 2003). Dicha capacidad es favorecida por reguladores de crecimiento, como se ha observado en *Cucúrbita pepo* (Urbanek *et al.* 2004), *Manihot esculenta* (Guohua,1998) y *Calliandra tweedii* (Kumar *et al.* 2007), los que mostraron organogénesis al aplicarles distintas dosis de auxinas y citocininas.

La producción de brotes múltiples es estimulada generalmente por citocininas (Frantini, 2002). BA actúa inhibiendo la zona meristemática apical; con lo que se induce la división celular alrededor del meristemo nodal y la epidermis circundante, estas divisiones celulares son inicialmente de tipo periclinal y posteriormente anticlinal y dan lugar a la iniciación de brotes múltiples, tal como lo describe Metha (2005), en su estudio con tamarindo, donde la aplicación de TDZ indujo la formación de brotes múltiples en la zona de los nodos cotiledonarios, en ese caso los brotes formados fueron de menor tamaño si se mantiene el TDZ en el medio.

REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

---

---

## DESCRIPCIONES ANATÓMICAS

Las descripciones de los cambios observados en la anatomía de las raíces de plántulas de *P. praecox* sometidas a los tratamientos con ANA y BA se presentan a continuación.

Control (Figura 9a). En sección transversal, la raíz del control presenta una epidermis uniestratificada, compuesta por células de 12  $\mu\text{m}$  de diámetro total tangencial, con escasos tricomas absorbentes de 180  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que el córtex está compuesto por aproximadamente 11 capas de células parenquimáticas isodiamétricas con las paredes delgadas y lúmenes amplios de aproximadamente 22  $\mu\text{m}$  de diámetro total tangencial, con pocos espacios intercelulares; las células próximas al cilindro vascular y a la epidermis son más pequeñas que las de la parte media; la endodermis no se encuentra claramente visible debido posiblemente a que los cortes fueron realizados a mano, por lo que fueron muy gruesos. En el cilindro vascular se observan ocho pequeños cordones xilemáticos compuestos por vasos pequeños, de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro total tangencial, entre estos cordones se puede observar floema; en la parte central de la raíz se forma una médula con un diámetro de 390  $\mu\text{m}$  que ocupa el 37% del cilindro vascular.

Tratamientos (Figura 9b y 9c). En la epidermis de los tratamientos BA 0.0  $\mu\text{M}$ , ANA 0.26  $\mu\text{M}$  y BA 0.0  $\mu\text{M}$ , ANA 0.54  $\mu\text{M}$  los tricomas no se desarrollan, mientras que en el resto de los tratamientos estos están presentes y son más numerosos en comparación con el control. En la zona del córtex no se muestran alteraciones o diferencias evidentes entre los tratamientos. En todos los tratamientos, en el cilindro vascular se observa una reducción del número de cordones xilemáticos comparándolos con el control. Los tratamientos BA 0.0  $\mu\text{M}$ , ANA 0.26  $\mu\text{M}$  y BA 0.0  $\mu\text{M}$ , ANA 0.54  $\mu\text{M}$  presentan un escaso desarrollo de los polos xilemáticos, los cuales se encuentran compuestos por escasos vasos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro total tangencial, los polos xilemáticos se encuentran acompañados por floema en la parte exterior. En estos tratamientos no se forma una médula. Por otro lado, en los tratamientos restantes se puede observar la formación de cuatro polos xilemáticos compuestos por vasos de 12  $\mu\text{m}$  alternados con bandas de xilema secundario; en la parte central de la raíz también se forma una médula con un diámetro de 312  $\mu\text{m}$ .

## REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)

Con respecto a la formación abundante de tricomas en las raíces en los tratamientos con BA, se ha observado en otros estudios por ejemplo, en *Arabidopsis*, que las raíces son muy sensibles a las citocininas, aun a concentraciones muy bajas. Se ha observado que en plántulas tratadas con concentraciones de 5 nM hasta 10  $\mu\text{M}$  de BA, el crecimiento de la raíz primaria se reduce, mientras que los pelos radiculares son estimulados. (Waisel *et al.*, 2002). Sin embargo, esta proliferación de pelos radiculares puede deberse a una acción indirecta de las citocininas, ya que éstas promueven la síntesis de etileno, el cual está ampliamente comprobado que estimula la proliferación de dichas estructuras (Waisel *et al.*, 2002). En diversos trabajos se ha comprobado que el etileno promueve la formación de pelos radiculares, así como su crecimiento (Bassin y Williamson, 1992; Waisel *et al.*, 2002). Se ha encontrado que en mutantes de *Arabidopsis* la formación, morfología y crecimiento de pelos radicales, se encuentran implicadas fitohormonas especialmente auxinas y etileno (Waisel *et al* 2002).

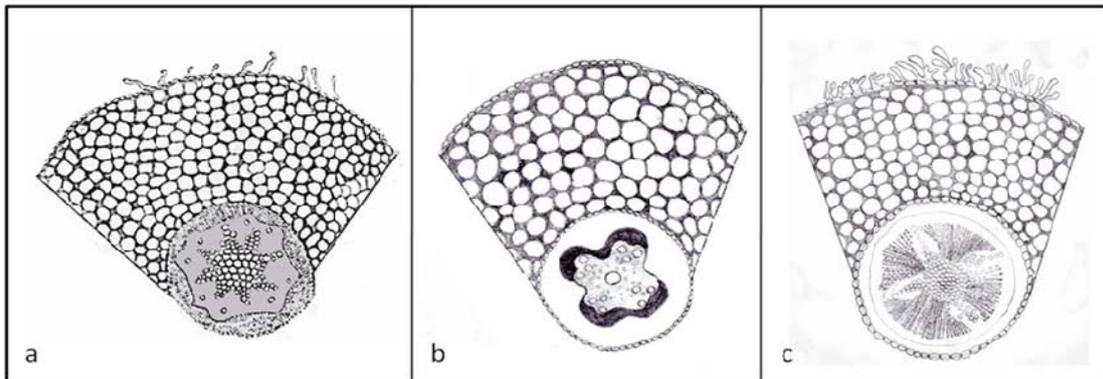


Figura 9. Secciones transversales de las raíces de *P. praecox* sometidas a distintos tratamientos. a) Control, b) respuesta representativa de las raíces en los tratamientos BA 0.0  $\mu\text{M}$  ANA 0.26  $\mu\text{M}$  y BA 0.0  $\mu\text{M}$  ANA 0.56  $\mu\text{M}$  y c) respuesta representativa de las raíces en los tratamientos BA 2.2  $\mu\text{M}$  ANA 0.26  $\mu\text{M}$ , BA 2.2  $\mu\text{M}$  ANA 0.54  $\mu\text{M}$ , BA 4.4 $\mu\text{M}$  ANA 0.26 $\mu\text{M}$  y BA 4.4  $\mu\text{M}$  ANA 0.56  $\mu\text{M}$ .

No se aprecian cambios evidentes en el córtex de ningún tratamiento y no se han encontrado trabajos que sirvan de comparación con los resultados obtenidos aquí. Los resultados de este trabajo parecen indicar que la aplicación de ANA inhibe la formación de médula y retrasa la maduración del cilindro vascular. Por otro lado, la aplicación combinada de ANA y BA promueven el desarrollo del sistema vascular. El papel de los reguladores de crecimiento durante el desarrollo del sistema vascular ha sido elucidado poco a poco los últimos años. Varios estudios han demostrado que el transporte polar de auxinas es necesario para la formación del patrón vascular y el establecimiento de bandas

---

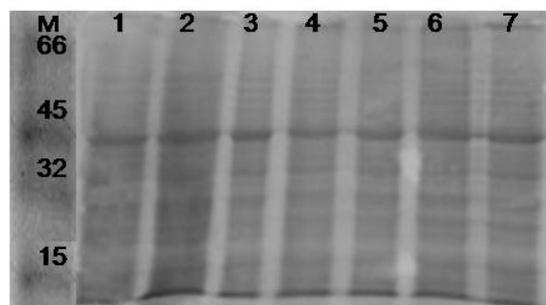
de procambium (Berleth *et al.*, 2007). Sin embargo, este mecanismo no es el único que explica la formación de los patrones definidos del sistema vascular. En células de mesófilo cultivadas *in vitro*, se pudo observar que con presencia de auxinas y citocininas se facilitó la formación de elementos traqueales (Dengler, 2001). Es por ello que se cree que las citocininas y las auxinas trabajan en conjunto para mantener los procesos de transdiferenciación, manteniendo la actividad del procambium y promoviendo la diferenciación de los elementos traqueales. Sin embargo, cada una de estas hormonas aplicadas por separado tiene diferentes efectos sobre el sistema vascular. Las citocininas actúan como un factor limitante y de control en la formación de elementos traqueales y elementos cribosos del floema (Aloni *et al.*, 1990). De hecho, en años recientes se ha demostrado que las citocininas regulan la proliferación de las células del procambium y la identidad de las células vasculares (Mähönen, 2005). Por su parte, la sola aplicación de auxinas exhibe un número pequeño de elementos traqueales y formación de elementos cribosos. Sin embargo, la aplicación conjunta de estos reguladores resulta en un incremento de la diferenciación celular (Aloni, 1982). Los resultados del presente trabajo concuerdan con los encontrados en la bibliografía puesto que todos los tratamientos con combinaciones de ANA y BA muestran un mayor desarrollo del cilindro vascular al observarse xilema secundario, mientras que los tratamientos en los que solo se aplicaron auxinas, se observó escaso desarrollo del cilindro vascular.

## PATRÓN PROTEICO

En el análisis de los geles de poliacrilamida se pudieron observar 11 bandas, las cuales se encuentran en las columnas de todas las muestras, por lo que no existen diferencias entre los patrones proteicos de ninguno de los tratamientos (Figura 10).

La aplicación de reguladores de crecimiento promovió cambios morfológicos y anatómicos de lo que se esperarían diferencias en la expresión de proteínas. Es posible que la prueba empleada no fuera lo suficientemente fina para observar los cambios. Este resultado es similar al obtenido por Balen (2002) al analizar proteínas extracelulares de *Mammillaria gracillis* relacionadas con cambios morfológicos, en el que la electroforesis sólo produjo unas cuantas proteínas específicas a las variaciones morfológicas, teniendo que recurrir a una electroforesis de dos dimensiones, la cual es una técnica más eficiente para la separación de proteínas. En ese trabajo también se observó que las diferencias más notables se encontraron entre los patrones proteicos de las proteínas extracelulares, ya que no correspondieron a las proteínas detectadas en el medio de cultivo de plantas normales (sin formación de callos).

La realización de un segundo análisis no fue posible por no contar con más material derivado de los cultivos. En futuros estudios se podría emplear el gel de poliacrilamida a una mayor concentración con lo que se permitiría una mayor separación de las proteínas de menor peso molecular durante la electroforesis. Otras técnicas como la inmunodetección y la electroforesis en dos dimensiones podrían ser más adecuadas para este tipo de trabajos.



---

Figura 10. Patrón proteico de proteínas solubles obtenidas de tejidos de plántulas de *P. praecox* de tres semanas de edad cultivadas *in vitro*. 1 BA 0.0  $\mu$ M ANA 0.26  $\mu$ M, 2 BA 0.0  $\mu$ M ANA 0.54  $\mu$ M, 3 BA 2.2  $\mu$ M ANA 0.26  $\mu$ M, 4 BA 2.2  $\mu$ M ANA 0.54  $\mu$ M, 5 BA 4.4  $\mu$ M ANA 0.26  $\mu$ M, 6 BA 4.4  $\mu$ M ANA 0.56  $\mu$ M y 7 control.

### CONCLUSIONES

- El cultivo *in vitro* de embriones de *Parkinsonia praecox* es una buena alternativa adecuada para la propagación de plantas viables.
- Los reguladores de crecimiento exógenos no son necesarios para la germinación de embriones cigóticos aislados.
- La aplicación de BA tiene un efecto adverso sobre el crecimiento de la raíz y del brote de *Parkinsonia praecox*.
- La aplicación de ANA no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de *P. praecox*.
- La aplicación de ANA promueve la aparición de raíces laterales e inhibe la formación de pelos radicales.
- La aplicación de BA suprime la formación de raíces laterales y estimula la proliferación de pelos radicales.
- La aplicación combinada de BA y ANA favorece el engrosamiento de las ramificaciones de las plántulas de *Parkinsonia praecox*.
- La aplicación combinada de BA y ANA indujo la formación de callo en raíz.
- La ausencia de reguladores de crecimiento en los callos formados a partir de embriones cigóticos de *Parkinsonia praecox* no promovió la formación de brotes ni de raíces, por lo que es necesario desarrollar un medio de diferenciación.
- La aplicación de ambos reguladores promovió cambios en el cilindro vascular así como en la epidermis de las raíces de *P. praecox*.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

- La reguladores BA y ANA no provocaron alteraciones en los patrones proteicos de *Parkinsonia praecox* a pesar de las diferencias morfológicas y anatómicas.

---

## REFERENCIAS

Abundiz - Bonilla. L. A. M., Barajas Morales, J. y Tenorio L. 2004. Anatomía de maderas de México: árboles y arbustos del matorral xerófilo de Tehuacan, Puebla. Instituto de Biología. UNAM.

Aguilar-Rodríguez, S. 1998. Técnicas de laboratorio para el estudio de las embriofitas. En: Tejero-Díez J.D. y Granillo V.M.P. Eds. *Plantae: Introducción al Estudio de las Plantas con Embrión*, pp. 275-285, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala, Tlalnepantla. Edo. de México.

Alesso, S. P., Araujo, P. y Tapias, R. 2003. Aprovechamiento de la goma de brea (*Cercidium praecox*) en bosques secundarios del Parque Chaqueño Seco. Influencia del tamaño de las heridas sobre la producción. *Quebracho* 10: 60-70.

Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. y Ullrich, C. I. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of botany* 97(5):883-93.

Arias, A. R. 2002. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón, "Maca". Tesis de Licenciatura Biólogo Mención: Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. EAP. de Ciencias Biológicas.

Balen, B., Milosevic, J. y Krsnik-Rasol, M. 2002. Protein and Glycoprotein Patterns Related to Morphogenesis in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *Tissue Culture. Food Technol, Biotechnol.* 40(4)275-280.

Beeckman, T., Burssens, S. e Inze, D. 2001. The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 52, 403-411.

Benson, E. E. 2000. Special Symposium: *In vitro* plant recalcitrance: an introduction: *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36: 141-148.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Berleth, T., Scarpella, E. y Prusinkiewicz, P. 2007. Towards the systems biology of auxin-transport-mediated patterning, *Trends in Plant Science* 12 (4), 151–159.

Boerjan, W., Cervera, M.-T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., van Onckelen, H., van Montagu, M. e Inze, D. 1995. Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*. 7, 1405–1419.

Bradford M.,M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

Bucher, E. H. y Huszar, P. C. 1999. Sustainable management of the Gran Chaco of South America: Ecological promise and economic constraints. *Journal of Environmental Management* 57: 99-108.

Burkart, A. y Carter, A. 1976. Notas en el género *Cercidium* (Caesalpinioideae) en Sud América. *Darwiniana* 20 (3-4): 305 – 311.

Caro L. A., Polci. P.A, Lindström L.I., Echenique C. V. y Hernández L. F. 2002. Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz from young and mature plants. *Biocell*: 26 (1) 25-35.

Carter, A. 1974. The genus *Cercidium* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in the Sonoran desert of Mexico and the United States. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 40 (2): 17-57.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. y Bennett, M.J. 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8, 165–171.

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P. J. y Bennett, M. 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843–852.

---

Celenza, J. L. Jr., Grisafi, P. L. y Fink, G. R. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9, 2131–2142.

Chang S. H. y Yang J. C. 1996. Enhancement of plant formation from embryo cultures of embryo of *Taxus mairei* using suitable medium and PVP. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 37: 35 – 40.

Chifa, C., Montenegro, S., Avallone, C. y Pire, S. 2000. Calidad polínica de las mieles producidas en el Depto. Güemes de la Prov. del Chaco (Argentina). *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.*

Davies, P. J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Segunda edición. Kluwer Academic Publishers.

Dávila, A. P., Villaseñor, R. J. L., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A., Sánchez-Ken, J. y Tenorio, L.P. 1993. Flora del Valle de Tehuacán–Cuicatlán. Listados Florísticos de México X. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 195 pp.

De Pinto, G. Rodríguez, O. Martínez, M. y Rivas C. 1993. Composition of *Cercidium praecox* gum exudates. *Biochemistry, Systematics and Ecology* 21(2): 297-300.

Dengler, N. G. 2001. Regulation of Vascular Development. *J Plant Growth Regul* 20, 1–13.

Frantini, R. y Ruiz, M. L. 2002. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* 38: 46 – 51.

González, M. y Peñalosa, C. 2000. *Biomoléculas. Métodos de Análisis.* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 256p.

González, M., Peñalosa, C., Perales, H. V., Salcedo, M.O., Sánchez, S., Vázquez, J., Flores, C. Quintanar, R., Delfín, I, Chino, S., Ruiz, P. y Moreno, R. 2003. *Biomoléculas. Manual de Laboratorio.* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Séptima Edición. México. 124p.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Green, C. E. y Phillips, R. L. 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*. 15: 417-421.

Guohua, M. 1998. Effect of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54: 1 – 7.

Guttman M, von Aderkas P. Label P y Lelu M. 1996. Effects of acid abscisic acid an somatic embryo mutation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 47:1905-1917.

Hamzah, M. B., Alang, Z. C. y Salekan, J. 1993. *In vitro* propagation de *Acacia mangium*, from young seedlings. *Tissue culture of Forest Species*. 129-132 p.

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J.A., Inze, D. y Beeckman, T. 2002. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339–2351.

Hobbie, L. y Estelle, M. 1995. The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* 7, 211–220.

Johnson, C. D. 1983. Ecología, Control e identificación de Insectos del Nuevo Mundo que Infestan la Semilla de *Prosopis* (*Leguminosae*). Organización de las Naciones Unidas. Liga:  
[http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/DOCREP/006/Q4165S/Q4165S06.html](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/006/Q4165S/Q4165S06.html)

Jones, C.A. Batchelor, P. y Harris, J.C. 1990. *In vitro* culture and propagation of *Acacia* species (*A. bivenosa*, *A. holosericea*, *A. salicina*, *A. saligna* and *A. sclerosperma*). *Intl. Tree Crops J.* 6: 183-192.

King, J. J., Stimart, D. P., Fisher, R. H. y Bleecker, A.B. 1995. A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 7, 2023–2037.

---

Kumar, S., Agrawal, V. y Gupta, S. C. 2002. Somatic embryogenesis in the Word legume *Calliandra twedii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71 : 77 -80.

Labrada, G. I. 2005. Propagación *in vitro* de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins (Caesalpinaceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. "Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 63 pp.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laskowski, M., J., Biller, S., Stanley, K. Kajstura, T. y Prusty, R. 2006. Expression profiling of auxin-treatment Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral growth emergence. *Plant Cell Physiology*. 47: 788-792.

Laskowski, M., J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C. y Sussex, I., M. 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121: 3303–3310.

Leshem, B., Ronen, R. y Lurie, S. 1994. Thidiazuron y Paclobutiazol apper mimic cytokinin and auxin influences on organ regeneration and protein profiles in cultures of melon cotyledons. *Journal of Plant Physiology* 143: 344-348.

Liang, Y. y Harris, J. M. 2005. Response of root breanching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes. *American Journal of Botany* 92(10): 1675–1683. 2005.

Losano, M. A. 1995. Producción de goma de brea (*Cercidium praecox* (R y P) Harms.). Sus relaciones con el estado hídrico, la concentración de carbohidratos no estructurales totales y el número y tamaño de las heridas. *Griscientia* 12: 25-32.

Losano M. A., Dottori, N. y Corsa, M. T. 2000. Secreciones intravasculares de sustancias gomosas en *Cercidium praecox* (Fabaceae). *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 71 (1): 1-9.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Maclsaac, S. A., Sawhney, V. K., Pohorecky, Y. 1989. Regulation of lateral root formation in lettuce (*Lactuca sativa*) seedling roots: Interacting effects of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid and kinetin. *Physiologia Plantarum*.77 (3), 287-293.

Malamy, J. E. y Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44.

Malik, K. A. y Saxena, P. K. 1992a. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius* A., *P. aureus* (L.) Wilczek, *P. coccineus* L., and *P. wrightii* L. *Plant Cell Reports*. 11:163–168.

Mangat, B. S., Pelekis, M. K. y Cassells, A. C. 1990. Changes in starch content during organogenesis in *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol. Plant*. 79: 267 – 274.

Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M. y Sandberg, G. 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*. 14, 589–597.

Marinucci, L., Ruscitti, M. y Abendini, W. 2004 Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 105 (2).

Martínez, E. 1986. Ecología, fitogeografía y variación intraespecífica de *Cercidium praecox* (Ruiz y Pavon) Harms. (Leguminosae) en Argentina. *Documents phytosociologie* 10(2):319-329.

Mata, M., Chávez, V. M. y Bye, R. 2001. *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea Chihuahuana* Martinez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37 (1): 73 – 78.

---

Mehta, U. J., Krishnamurthy, K. V. y Hazra, S. 2000. Regeneration of plants via adventitious bud formation from mature zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Current Science*. 78 (10): 1231 – 1234.

Mehta, U. J., Sahasrabudhe, N. y Hazra, S. 2005. Thidiazuron – Induced morphogenesis in tamarind seedlings. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*. 41 (3): 240 – 243.

Mikula, A., Tykarska, T., Zielinska, M., ; Kuras, M. y Rybaczynski, J. J. 2004. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis . *Acta biologica cracoviensia Series Botanica*. 46: 106 -120.

Mittal, A., Agarwall, R. y Gupta, S. C. 1989. *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 9: 65-70.

Mok, D. W. S., y Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 52, 89–118.

Montaño, A. N. M. y Monroy, A. A. 2000. Conservación ecológica de suelos en zonas áridas y semiáridas en México. *Ciencia y Desarrollo*. SEP-CONACyT. Vol. XXVI 154: 27-37.

Mukul, M. D. y Sumita, J. 2004. Embryo Culture of *Taxus wallichiana* (Zucc). *J. Plant Biotechnology*. 6(4). pp. 213-219.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*.15: 473-497.

Nikolic, R., Mitic, N., Miletic, R. and Neskovic, M. 2006. Effects of Cytokinins on *In Vitro* Seed Germination and Early Seedling Morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulators*. 25:187–194

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Olvera, M. T. 2006. Evaluación de los reguladores auxínicos AIA, AIB y p-nitrofenil-indol-3-acetato en la rizogénesis de *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Mimosa luisana* de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 83 pp.

Osmont, S. K., Sibout, R. y Hardtke, C. S. 2007. Hidden Branches: Development in Root System Architecture. *Annual Review Plant Biology* 58: 98-113.

Paez, S. A. y Marco, D. E. 2000. Seedling habitat structure in dry Chaco forest (Argentina). *Journal of Arid Environments*, 46: 57-68.

Pennington, T. D. y Sarukhán, J. 2005. Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies. UNAM-FCE, México.

Pollard, J. W. y Walker, M. 1998. *Methods in Molecular Biology Volume 6: Plant Cell and Tissue Culture*. Human Press, New Jersey, U.S.A.

Quoirin, M., Bittencourt, J. M., Zanette, F. y Oliveira, D. E. 1998. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured in vitro. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*: 10 (2): 101 – 105.

Raghavan, V. 2003. One hundred of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*. 39: 437 – 442.

Rahman, A., Amakawa, T., Goto, N., y Tsurumi, S. 2001. Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol*. 42: 301–307.

Ranga Rao, G. V. y Prasad, M. N. V. 1991. Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*. *Journal of Plant Physiology* 137: 625:627.

Razda, M. K. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. Science Publisher Inc. Segunda Edición. U. S. A. 347 p.

---

Rzedowski J. 1988. Vegetación de México. México. Limusa. 432p.

Sacher, J. A. 1956. Observations on pine embryos grown *in vitro*. *Bot. Gaz.* 117 (3): 203 – 214.

Salisbury, F. B., y Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal. México. Grupo Editorial Iberoamericana. 759p.

Sandoval E. Z. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM.

Shelton, M. 2000. Leguminosas forrajeras tropicales en los sistemas agroforestales. *Unasyva* 200, 51: 25 -32.

Silveira V, Floh E. I. S., Handro y Guerra M. P. 2004. Effect of plant growth and levels of intracellular protein, strach and polyamines in embryogenic suspencion cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 76 :53-60

Singh, H. P., Singh, S., Saxena, R. P. y Singh, R. K. 1993. *In vitro* bud breaks in axillary nodal segments of mature trees of *Acacia nilotica*. *Journal of Plant Physiology.* 36 (1): 21-24.

Skoog, F. y Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In Biological action of growth substances. XI Symposium of Society of Experimental Biology. Cambridge University Press. 11 :118-131.

Slankis V.1950. Effect of a-napthalene acetic acid on dichotomous branching of isolated roots of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 3: 40 - 44.

Stirk, W. A., Gold, J. D., Novak, O., Strnad, M. y van Staden, J. 2005. Changes in endogenous cytokinins during germination and seedling establishment of *Tagetes minuta* L. 2005. *Plant Growth Regul.* 47:1–7.

**REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS DE *Parkinsonia  
praecox* (RUIZ Y PAVON) HAWKINS (CESALPINIACEAE)**

---

Taiz y Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Tercera edicion. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, MA, USA.

Torrey, J. G. 1962. Auxin and purine Interactions in Lateral Root Initiation in Isolated Pea Root Segments. *Physiologia Plantarum* 15 (1), 177 - 185

Urbanek, A., Zechman, B. y Muller, M. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: cytological and biochemical investigations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79 : 329- 340.

Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Villaseñor, J. L. y J. Ortega. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Soc. Bot. Mex.* 67: 24-74.

Van Staden, J. y Ntingane, B.M. 1996. The effect of a combination of decapitation treatments, zeatin and benzyladenine on the initiation and emergence of lateral roots in *Pisum sativum*. *South African Journal of Botany* 62, 11-16.

Vandenbussche, F., Vriezen, W. H., Smalle, J., Laarhoven, L. J. J., Harren, F. J. M., y Van Der Straeten, D. (2003). Ethylene and auxin control decreased light intensity. *Plant Physiol.* 133: 517–527.

Vaz, A. P., Kerbauy, G. B. y Figueiredo – Ribeiro, R. C. L. 1998. Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (ORCHIDACEAE). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 105 – 111.

Vázquez – Ramos, J. M., Arellano, Y. y García, E. 2008. Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia* 42 (6) 637 - 644.

Vázquez-Yanes, C. y Batis, A. I. 1996. Adopción de árboles nativos valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. *Bol. Soc. Bot. México.* 58: 75-84p.

---

Waisel, Y., Esthel, A. y Kafkafi, U. 2002. *Plant Roots : The hidden Half*. Marcel Decher Inc. USA. 1120.

Xie, D. y Hong, Y. 2001. *In vitro* regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66: 167 -173.

Xueqin, L. y Leung, D. W. M. 2002a. Culture of zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part I: factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* 38: 191 - 197.

Xueqin, L. y Leung, D. W.M. 2002b. Culture of zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part II: Biochemical changes associated with the conversion of isolated embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* 38: 198 - 202.

Yépez, L. 1998. Micropropagación *in vitro* en *Agave cocui* Trelease. *Informe final Pasantía Cultivo de Tejidos*. UCV, Caracas. Mimeografiado. 38 p.

Zuloaga, F. O. y Morrone, O. 1999. Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina. Dicotyledoneae. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 74: 1-1246.

## ANEXO 1

### ABREVIATURAS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO MENCIONADOS

**2,4-D** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**AIA (IAA)** Ácido indolacético

**AIB (IBA)** Ácido indolbutírico

**ANA** Ácido a-naftalenacético

**BA** 6-benciladenina

**KIN** Cinetina

**MS** Medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog, 1962

**TDZ** Thidiazuron

**GA<sub>3</sub>** Acido giberélico