



---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## FACULTAD DE CIENCIAS

Organogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana*

Martínez (Pinaceae)

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (Biología Vegetal)

PRESENTA

**LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

MÉXICO, D. F.

2012



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.



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y co-dirección del Dr. Robert Bye Boettler.

Los estudios histológicos se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Judith Márquez Guzmán.

El trabajo formó parte del Proyecto de Investigación "Morfogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez Gymnospermae, especie en peligro de extinción" apoyado por PAPIIT-DGAPA, UNAM (Clave: IN205194).



## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Al Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM, por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis.
- Al CONACYT, por la Beca Nacional para realizar los estudios de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal) en la Facultad de Ciencias UNAM, (Número de registro: 88035) Febrero de 1994 a febrero de 1996.
- A las autoridades académicas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la aprobación del permiso para la conclusión del trabajo escrito y la obtención del grado de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal) (2011-2012).
- Al programa Bosque Modelo Chihuahua A.C., por proporcionar el material biológico (semillas) para el desarrollo de esta tesis, así como las facilidades otorgadas para visitar las poblaciones de *Picea chihuahuana*.
- Al comité tutorial: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, director de tesis; al Dr. Robert Bye Boettler y a la Dra. Judith Márquez Guzmán. Gracias por su formal orientación académica, el interés y seguimiento mostrado al presente trabajo y por sus inmejorables comentarios y sugerencias para la conclusión del mismo.
- A los sinodales: Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, Dra. Sonia Vázquez Santana y Dra. Ana Laura López Escamilla, por el apoyo, por la paciencia, por la detallada revisión al manuscrito, y los valiosos comentarios y sugerencias.
- A la Dra. Sonia Vázquez Santana, la Dra. Silvia Espinosa Matías, la Dra. Clara Esquivel Huesca, la Dra. Citlali Núñez Mariel, la Dra. Guillermina Murguía y al M. en C. Ricardo Wong, por su paciencia y constante asesoría técnica para la realización de las técnicas histológicas.
- Al M. en C. Alejandro Martínez Mena, al Pas. de Biól. José Antonio Hernández Gómez y a la M. en C. Ana Isabel Bieler Antolin, del

Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la toma de micrografías y escaneo de diapositivas.

- Al M. en C. Aquiles Bernal Moreno y M. en C. Ubaldo Guzmán Villa por el apoyo técnico en computación.
- A la Biól. Isabel Mejía Luna, la Biól. Jazmín Samario Román y la Biól. Ana Laura Soto Constantino, por la ayuda técnica para la revisión de instalaciones y la atención a usuarios de la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias durante la conclusión del trabajo escrito.
- Dr. Adolfo Andrade Cetto, por el apoyo otorgado para la conclusión de la presente tesis.



*Gracias también a:*

Mis inolvidables compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM: Ana Laura López, Laura Miranda, Isaac Reyes, Elizabeth Arriaga, Noemí Barrón, Alejandro Martínez Palacios, Lucy Rangel, Karina Duval, Marco Antonio García, Miriam Ladd, Álvaro Namorado, Martín Mata, Inés Vargas, Verónica Cervantes, Gema Galindo y Víctor Chávez, por su amistad, por el apoyo constante, por ser una guía y compartir sus conocimientos en el área, por ser parte importante de mi formación académica y más que nada...*por los buenos tiempos!*

Muy especialmente a Ana Laura, por su gran amistad, infinita paciencia y apoyo incondicional en el pasado, presente y futuro de mi vida académica, y de la vida vida.

La Dra. Judith Márquez, por todo su apoyo académico, por incorporarme a las filas docentes de la Facultad y por su confianza al proporcionarme un “nicho ecológico” temporal en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas.

A mis colegas profesoras del Taller “Biología de la Reproducción, Propagación y Fisiología de Angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”: Dra. Judith Márquez, Dra. Margarita Collazo, Dra. Sonia Vázquez, Dra. Ana Laura López y Dra. Karina Jiménez, por su amistad y apoyo mientras me ausenté de la docencia para concluir la tesis.

A todos los alumnos y exalumnos del Taller, especialmente a Oyuki Licon, Loui Saby, Edgardo Mendoza, Alma Yadira Martínez, Berenice Díaz, Hilda Zamora, Dulce Yaahid Flores, Rebeca Hernández, Erick Arcos, Amelia López, José Carlos Méndez, Laura Lorena Rodríguez, Lourdes Vázquez, Alejandra Isidoro, Nancy Candido y Clarita Soto, por el apoyo, porras y paciencia, pero sobre todo ser mis amig@s.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Ambientes Controlados y Laboratorio de Etnofarmacología: Eddy Martínez, Jaime Becerra, Ana Laura Soto, Isabel Mejía, Paola Alvarado, Luisa Rubalcaba, Marel Medina, Christian Cabello y Jazmín Samario, por su apoyo en la Unidad y hacer agradable cada día de trabajo.

A Reyna Osuna, por su apoyo de toda la vida y gran amistad.

Al M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez, por el apoyo académico, por contar siempre con sus oportunos comentarios, y por brindarme su amistad.

Al M. en C. Ricardo de Santiago Gómez por las sugerencias, las correcciones ortográficas y ayuda técnica en la etapa final del trabajo escrito, pero sobre todo por su enorme bondad, paciencia y gran amistad.

Tlalmazacoatl: axcan noyollotl nipaqui, nimitztlazohtla. Canauhtli.

Y a todos aquellos colegas y amigos que influyeron positivamente con sus buenos, malos y/o realistas comentarios, además de las constantes llamadas de atención para la conclusión de esta fase académica. Gracias a Santiago Martínez Calvillo, Eberto Novelo, Guillermo Laguna, Mague Collazo, Almita Yadira, María Eugenia Muñiz, Pedro Mendoza, Ignacio Morales, Halina Wiczorek, Rosenda Hernández, Francisco Huitrón, Guille Cruz Pérez, y Rafael Serrano.



*Dedicatoria*

*Con profundo agradecimientos a mis padres Meche y Teo, por su amor, su apoyo incondicional y por comprender las ausencias prolongadas para la conclusión de esta tesis.*

*A mis hermanos Lorena, Arturo y Ana Perla, por lo mucho que los quiero.*

*A mi cuñada Angélica por su ejemplo de fortaleza.*

*A los dos grandes motores de mi vida: Emilio y Natalia.*

*A mis tíos Sergio y María Elena, y a Mariana, por estar conmigo siempre y recordarme cada día la importancia de ser una familia unida.*

*A mis tíos Juan y Carmelita, al igual que a Adriana, David y Juan José. Gracias por todo, los quiero!*

*A Ana Laura, por lo mucho que la admiro y por convertirse en parte importante de mi familia.*

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
• El género <i>Picea</i> en México	9
• <i>Picea chihuahuana</i> Martínez	10
○ Distribución	11
○ Hábitat	14
○ Vegetación asociada	14
○ Evolución	15
○ Categoría de extinción	17
○ Problemas de extinción	23
○ Conservación	25
• Cultivo de Tejidos Vegetales: una alternativa para la propagación de coníferas	27
○ Desarrollo de yemas axilares (yemas preformadas)	29
○ Inducción y desarrollo de brotes adventicios	29
• Selección del explante	32
• Medios nutritivos	34
• Condiciones de incubación	39
○ Inducción y desarrollo de embriones somáticos	43
○ Estudios histológicos en coníferas	45
○ Estudios <i>in vitro</i> realizados en <i>Picea chihuahuana</i>	51
JUSTIFICACIÓN	54
OBJETIVOS	54
• General	
• Particulares	
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Cultivo de Tejidos	55
• Material biológico	55
• Desinfección del material biológico	57
• Medios de cultivo y condiciones de incubación	57
○ Ensayo 1	57
○ Ensayo 2	57
○ Ensayo 3	59

• Análisis estadístico	59
2. Análisis Estructural	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
1. Cultivo de Tejidos	64
• Respuestas morfogénicas	64
• Organogénesis	67
o Ensayo 1 (Medio B5 modificado)	67
a) Tratamientos con K/2,4-D	67
b) Tratamientos con BA/ANA	69
o Ensayo 2 (Medios B5 modificado, MS y SH)	72
a) Medio de inducción (30 días)	73
b) Medio de proliferación	75
o Ensayo 3 (SH + K 5mgL <sup>-1</sup> )	83
a) SH + K 5mgL <sup>-1</sup> (30 días de inducción)	86
b) SH + K 5mgL <sup>-1</sup> (60 días de inducción)	87
2. Análisis estructural	93
CONCLUSIONES	107
ANEXOS	109
BIBLIOGRAFÍA	118

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
AIB	Ácido Indol-3-butírico
ANA	Ácido $\alpha$ -Naftalenacético
BA	6-Bencilaminopurina
2iP	N <sup>6</sup> -(2-isopentenil)adenina / 6-( $\gamma$ , $\gamma$ -Dimetilalilamino)purina
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
FAA	Formaldehído : Ácido acético : Etanol : Agua
GD	Medio Gresshoff y Doy
K	Kinetina / N <sup>6</sup> -Furfuriladenina / 6-Furfurilaminopurina
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
PAS	Ácido peryódico - Reactivo de Schiff
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SH	Medio Schenk y Hildebrandt (1972) modificado por Reilly y Washer, 1977
S-VR	Safranina – Verde Rápido
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Z	Zeatina

## RESUMEN

*Picea chihuahuana* Martínez (Pinaceae) es una especie endémica en peligro de extinción considerada un relictos de los bosques mexicanos antiguos. Embriones cigóticos de esta especie fueron cultivados *in vitro* para determinar las mejores concentraciones hormonales, el mejor medio de cultivo y el tiempo de inducción adecuado para la proliferación de brotes adventicios, así mismo para registrar los eventos histológicos que se manifestaron durante la diferenciación de los brotes con el fin de llegar a establecer una metodología adecuada para la micropropagación de esta especie forestal.

Se realizaron 3 ensayos. En el primero, los embriones fueron cultivados, bajo condiciones de luz (fotoperiodo) y oscuridad, en medio B5 modificado con dos series de reguladores de crecimiento citocinina/auxina: 6-Bencilaminopurina/Ácido Naftalenacético y Kinetina/Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, las citocininas en concentraciones de 0-5 mgL<sup>-1</sup> y las auxinas de 0-4 mgL<sup>-1</sup>, haciendo un total de 49 tratamientos (ensayo 1). Los resultados del ensayo 1 permitieron obtener las mejores concentraciones para la formación de brotes de cada serie de reguladores, las cuales fueron repetidas utilizando tres medios de inducción adicionados con antioxidantes: Murashige y Skoog, B5 modificado, y Schenk y Hildebrandt (ensayo 2). Finalmente, en el ensayo 3 se determinó que el mejor tratamiento para la proliferación de brotes adventicios de *P. chihuahuana* se obtuvo utilizando Kinetina 5 mgL<sup>-1</sup> en el medio el Schenk y Hildebrandt, adicionado con antioxidantes, y proporcionando un tiempo de inducción de 60 días, obteniéndose un promedio de 18.1 brotes por embrión.

El análisis histológico mostró que en las capas subepidérmicas de los cotiledones ocurrieron divisiones periclinales y anticlinales que originaron agrupaciones de tres y cuatro células, las cuales precedieron la formación de meristemoides que posteriormente dieron origen a los brotes adventicios.

## INTRODUCCIÓN

*Picea chihuahuana* Martínez (Pinaceae) es una especie en riesgo de extinción. Este abeto es considerado un relictó endémico de los bosques antiguos; Sánchez y Cano (1997) reportaron la existencia de solo 26 poblaciones naturales aisladas con cerca de 16 000 individuos distribuidos en menos de 200 hectáreas. Actualmente su distribución está limitada a los estados de Chihuahua y Durango (Taylor y Patterson, 1980; Jacob, 1994; Bye, 1995, 1997).

Su reproducción natural ha disminuido considerablemente a causa de diversas actividades humanas, la pérdida de su capacidad regenerativa y su alto índice de fijación genética. Sumado a esto, el grave problema que representa la elevada proporción de semillas vacías (45%) y su pérdida (95%) causadas por la palomilla *Cydia phyllisi* Miller cuyas larvas desarrollan parte de su ciclo de vida en el interior de los conos alimentándose del contenido de las semillas (SARH, 1993; Jacob, 1994; Ledig *et al.*, 1997).

Por lo anterior, la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) la incluye actualmente en su lista roja de especies amenazadas como especie "En Peligro" (UICN, 2011), y la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 la ubica como especie "En Peligro de Extinción" (SEMARNAT, 2010).

Las técnicas *in vitro* ofrecen la oportunidad de incrementar y mejorar el crecimiento y desarrollo de especies forestales en un esfuerzo para ayudar a preservar los recursos genéticos (Gupta y Durzan, 1991; Schwarz *et al.*, 1991; Harry y Thorpe, 1994; García-Ferriz, 1994; Nandwani *et al.*, 2001; Vooková y Kormuťák, 2003), por lo que es importante generar sistemas eficientes de propagación en los cuales se incluyan estudios sobre la capacidad regenerativa de los explantes y así determinar la etapa en la que éstos sean más competentes para el desarrollo de un mayor número de brotes, así mismo, investigar las etapas previas a su desarrollo

para comprender los procesos de diferenciación que ocurren durante la formación de los brotes adventicios (Patel y Berlyn, 1983; Villalobos, 1983; Villalobos *et al.*, 1985; von Arnold y Ericksson, 1985; Flinn *et al.*, 1988; López-Escamilla, 2000; García, 2003).

Los estudios sobre la propagación *in vitro* de *P. chihuahuana* hasta la fecha son escasos. Dada la importancia evolutiva y ecológica de esta especie, el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones del cultivo *in vitro* para la inducción de respuestas morfogénicas a partir de embriones maduros, así como realizar el análisis estructural para determinar la identidad y los cambios ontogénicos, registrando los eventos citológicos que se manifiestan antes de la diferenciación y formación de brotes adventicios, como punto de partida para llegar a establecer una metodología adecuada para la micropropagación de esta especie en peligro de extinción.

## ANTECEDENTES

Los bosques de coníferas son críticos para la estabilidad de numerosos hábitats forestales, siendo con frecuencia especies que habitan terrenos difíciles y escarpados, controlando el flujo de agua y reduciendo la erosión de las áreas montañosas. Su importancia en la regulación del clima y la biodiversidad, así como fuente de recursos naturales económicamente importantes, maderables y no maderables, han hecho de las coníferas un grupo particularmente vulnerable para la deforestación provocando la fragmentación de su hábitat (Cairns *et al.*, 1995; Thomas y Tripp, 1998).

En México, los bosques de pino-encino que cubren la Sierra Madre Occidental cuentan con una gran riqueza en plantas vasculares: se calcula que albergan unas 7,000 especies, de las cuales más de 4,000 son endémicas. Desafortunadamente, y a pesar de su importancia, hasta ahora es una de las floras menos conocidas (Rzedowski, 1993; Dávila y Germán, 1991, citados por Bye, 1995; Bye, 1997).

Esta cadena montañosa ha servido como corredor para la migración hacia el sur de plantas que se originaron en zonas templadas y, hacia el norte por plantas de zonas tropicales, al mismo tiempo ha sido una barrera y refugio de endemismos (Bye, 1997). Los rangos de altitud que alcanza van de los 200 a más de 3,000 msnm, por lo que el clima predominante es templado-húmedo. En altitudes elevadas la vegetación está dominada por bosques de coníferas-encinos que albergan varios taxa de *Quercus*, *Alnus*, *Arbutus* y *Populus*, pero conformados principalmente por los géneros *Pinus*, *Abies*, *Pseudotsuga* y *Picea* (Bye, 1995).

Las Pináceas tienen en la flora mexicana enorme importancia ornamental y forestal. Nuestro país representa uno de los dos centros de riqueza de coníferas en el mundo: de las 100 especies del género *Pinus*, 49 están en México (Styles, 1993). Esta Familia incluye también al género *Picea*, uno de los géneros arbóreos económicamente más importantes, considerado la base de la industria forestal de

Canadá y el Norte de los Estados Unidos Americanos, principalmente para la producción de celulosa y madera (Gupta *et al.*, 1993).

*Picea* se considera un género taxonómicamente difícil debido a que sus especies abarcan un rango relativamente estrecho en su morfología y preferencias ecológicas. Para los taxónomos no ha sido fácil delimitar las especies y construir sus filogenias (Ledig *et al.*, 2004). El número cromosómico diploide ( $2n=24$ ) es altamente consistente y tiene origen monofilético (Gordon, 1968). Es un género restringido al hemisferio norte y, dependiendo de los taxónomos, incluye de 28-31 a 50 especies (Everett, 1981, citado por Ledig *et al.*, 1997), sin embargo la mayoría ha aceptado 36-37 especies, sin considerar a *P. martinezii* que fue descrita en 1988. Por su parte, Farjon (2001) reconoce 34 especies, tres subespecies y 15 variedades.

Boratyńska (2007) consideró solo nueve especies para Norteamérica e incluye, como especies de grandes áreas de distribución, a *P. engelmannii* (Parry) Engelm., *P. glauca* (Moench) Voss, *P. mariana* (Mill.) Britt., *P. pungens* Engelm., *P. rubens* Sarg. y a *P. sitchensis* (Bong.) Carr.; y como especies de áreas restringidas menciona a *P. breweriana* S. Wats., *P. mexicana* Martínez y a *P. chihuahuana* Martínez, siendo éstas dos últimas las que marcan el límite sur de *Picea*, sin incluir nuevamente a *P. martinezii*. Del total de los diez taxa presentes en Norteamérica, seis se encuentran en Estados Unidos y México, y de estas seis, cuatro son consideradas relictos endémicos con base en la evidencia fósil: *P. martinezii*, *P. chihuahuana*, *P. mexicana* y *P. breweriana* (Ledig *et al.*, 2004).

La mayoría de las especies están en Asia, y no obstante son predominantemente boreales y crecen en climas fríos, en Taiwán y México las especies se extienden hasta el sur del Trópico de Cáncer (Ledig *et al.*, 2004).

## El género *Picea* en México

Antes de 1942 no se conocían representantes de este género en México (Martínez, 1953; Gordon, 1968); actualmente la distribución de sus poblaciones está restringida a la parte Norte de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental en los estados de Chihuahua, Durango, Coahuila y Nuevo León (Taylor y Patterson, 1980; Patterson, 1988).

En nuestro país, el género *Picea* consta sólo de 3 especies (Martínez, 1953; Taylor y Patterson, 1980; Patterson, 1988; Taylor *et al.*, 1994):

- *Picea martinezii* T. E. Patterson
- *Picea engelmannii* Parry var. *mexicana* (Martínez) Taylor & Patterson
- *Picea chihuahuana* Martínez

*Picea martinezii* es una especie de montañas templadas que crece entre los 2,150 a 2,500 msnm, exclusivamente en dos localidades de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León. Al igual que *P. chihuahuana*, se considera también un relicto que habita en las orillas de los arroyos en los valles montañosos donde los niveles de humedad son más elevados, por lo que fue confundida con ésta, sin embargo se consideró una especie diferente debido a que el tamaño de sus conos y de las semillas es mayor, por diferencias en la composición química de la resina y por su ubicación geográfica (Taylor y Patterson, 1980; Taylor *et al.*, 1994; CONABIO-CONANP, 2009).

*Picea engelmannii* var. *mexicana* es una especie subalpina que crece por arriba de los 3,400 msnm. Fue descrita originalmente por Martínez en 1961 (citado por Gordon, 1968) como *Picea mexicana*, no obstante los estudios taxonómicos realizados por Taylor y Patterson (1980) indicaron que las diferencias con *Picea engelmannii* no eran suficientes para separarlas como dos especies distintas, por lo que propusieron que *Picea mexicana* fuera reducida a nivel de variedad, quedando como *Picea engelmannii* var. *mexicana* (Taylor y Patterson, 1980; Taylor *et al.*,

1994). Por su parte Gordon (1988, comunicación personal citado por Ledig *et al.*, 2004), menciona que las diferencias entre *P. mexicana* y *P. engelmannii* fueron suficientes para garantizar su reconocimiento como especies distintas.

Las escasas poblaciones de *Picea*, consideradas relictos endémicos, son importantes debido a que la distribución de este género en nuestro país es la que se conoce más al sur en Norteamérica; además es posible que sean los descendientes de las primeras poblaciones de pinabetos que habitaron el continente americano y, debido a los cambios climáticos originados por glaciaciones y periodos de calentamiento de la Tierra, hacia el final del Pleistoceno sus áreas de distribución fueron retraídas hacia el Norte provocando que actualmente ocupe lugares reducidos y aislados de México (Gordon, 1968; Ortega, 1997; Ledig *et al.*, 2004).

### ***Picea chihuahuana* Martínez**

*Picea chihuahuana*, conocida localmente como “cahuite”, “cahuite espinoso”, “cahuite bravo”, “pinabete” y “pinabete espinoso”, o por los nativos Tarahumaras de la Barranca del Cobre como “matego” o “mategoco”, es una especie de valor forestal y ornamental que alcanza de 25 a 30 m de altura (Martínez, 1942, 1948; SARH-SSF, sin fecha; Ledig *et al.*, 2000) (Figura 1, Anexo 1 y 2).

Fue encontrada por el señor Rigoberto Dueñas en Talayotes, Municipio de Bocoyna, Chihuahua, al Noroeste de México, e identificada y descrita como una especie nueva por Maximino Martínez en 1942, posteriormente se localizó también en otros escasos sitios de Chihuahua y Durango (Martínez, 1953; Gordon, 1968).



Fig. 1. *Picea chihuahuana*, ejemplar adulto en su hábitat cerca de San Juanito, Chih.

**Distribución:** *P. chihuahuana* se distribuye entre los 23° 20' N (al sur del Trópico de Cáncer) y los 28° 39' N. La distancia entre la población más septentrional (en estado de Chihuahua, al norte de la Barranca del Cobre) y la más meridional (en el estado de Durango) es de 687 Km y dentro de este rango se le encuentra en poblaciones dispersas de escasos individuos. Las poblaciones difieren ampliamente en su frecuencia de alelos como resultado de su deriva genética al azar, lo que sugiere su estatus relictual (Ledig *et al.*, 2000; Ledig *et al.*, 2004).

Narváez (1984) y Sánchez (1984) (citados por Sánchez y Cano, 1997) mencionaron que la especie está limitada a estos dos estados y, para el año 1984, reportaron un número aproximado de 16,000 individuos: 14,000 en Chihuahua y 2,000 en Durango. La población total de *P. chihuahuana* se encuentra fragmentada en pequeños parajes aislados que aproximadamente cubren 157 hectáreas en Chihuahua y una superficie menor en Durango (Sánchez y Cano, 1997). Para este último estado, se reporta que en el área protegida del Valle de Santa Bárbara se le encuentra en una superficie limitada a 20 hectáreas, sitio cuya proximidad al Trópico de Cáncer proporciona un clima templado el cual es poco común para el género *Picea* (Aguirre *et al.*, 2003). Por otra parte, Conifer Specialist Group (1998) menciona que se le encuentra en aproximadamente 25 sitios con unos pocos a varios cientos de árboles.

Ledig *et al.* (1997) reportaron que la población más pequeña en Chihuahua constaba solamente de 15 árboles maduros y la más grande de 2,441; de estas poblaciones, sólo tres albergaban más de 1,000 individuos adultos. Por otra parte señalan que en Durango las poblaciones no habían sido censadas y, considerando que se hiciera una estimación generosa, el total de los árboles no superaría los 20,000.

En virtud de las inconsistencias en la información existente relacionada con la ubicación de las localidades de las piceas mexicanas, o bien, debido a que la información estaba incompleta, incorrecta o de difícil acceso, en 2000, Ledig *et al.*

publicaron un estudio sobre la localización exacta de los rodales de *Picea* en México con el fin de hacerlos accesibles a los estudios científicos e identificar sitios dignos de conservación, realizar un censo y determinar el estado de salud de los árboles. Datos de un conteo combinado con el censo realizado por Narváez (1984, citado por Ledig *et al.*, 2000) arrojó que el total de árboles de *P. chihuahuana* en ambos estados fue de 42, 610, incluyendo 24, 221 individuos jóvenes y adultos y 18 389 plántulas (0.3 a 2 m). No obstante que el número de plántulas podría indicar que la especie se está reproduciendo, la proporción de plántulas a árboles jóvenes, y de jóvenes a árboles maduros fue muy baja indicando que la especie puede encontrarse en serio peligro de conservación. Los árboles más altos midieron 50 m y 125 cm de diámetro a la altura del pecho y el tamaño pareció decrecer en las poblaciones más al norte. Se calculó también, por el conteo de los anillos de crecimiento en algunos tocones, que los árboles adultos de *P. chihuahuana* podrían alcanzar los 272 años de edad lo cual el autor considera como de ciclo de vida corto, comparado con otras piceas norteamericanas que alcanzan entre los 600 y 900 años de edad. La figura 2 muestra un mapa con los sitios de distribución de las especies de *Picea* en nuestro país.

No obstante que en la literatura se menciona que es una especie de distribución limitada a un par de estados en la República Mexicana, en los listados de la Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2001 y NOM-059-SEMARNAT-2010, se reporta como “no endémica”, pese a que definen “especie endémica” como “Aquella cuyo ámbito de distribución natural se encuentra circunscrito únicamente al Territorio Nacional y a las zonas donde la Nación ejerce su soberanía y jurisdicción” (SEMARNAT, 2002 y 2010). Lo anterior resulta contradictorio, pues a pesar que diversos autores la mencionan como especie endémica o “relicto endémico” (Narváez (1984) y Sánchez (1984), citados por Sánchez y Cano, 1997; Ledig *et al.*, 2000; Ledig *et al.*, 2004; García-Arévalo, 2008), y que la IUCN la menciona como “nativa de México” (IUCN, 2011), los dos últimos listados de la SEMARNAT la reportan como “no endémica”, lo cual refleja la necesidad de hacer

una revisión más detallada de dichos listados por parte de los especialistas en el grupo, no sólo de la categoría de riesgo en la que será incluida la especie, sino también actualizando o corrigiendo su distribución geográfica en el caso de ser necesario.

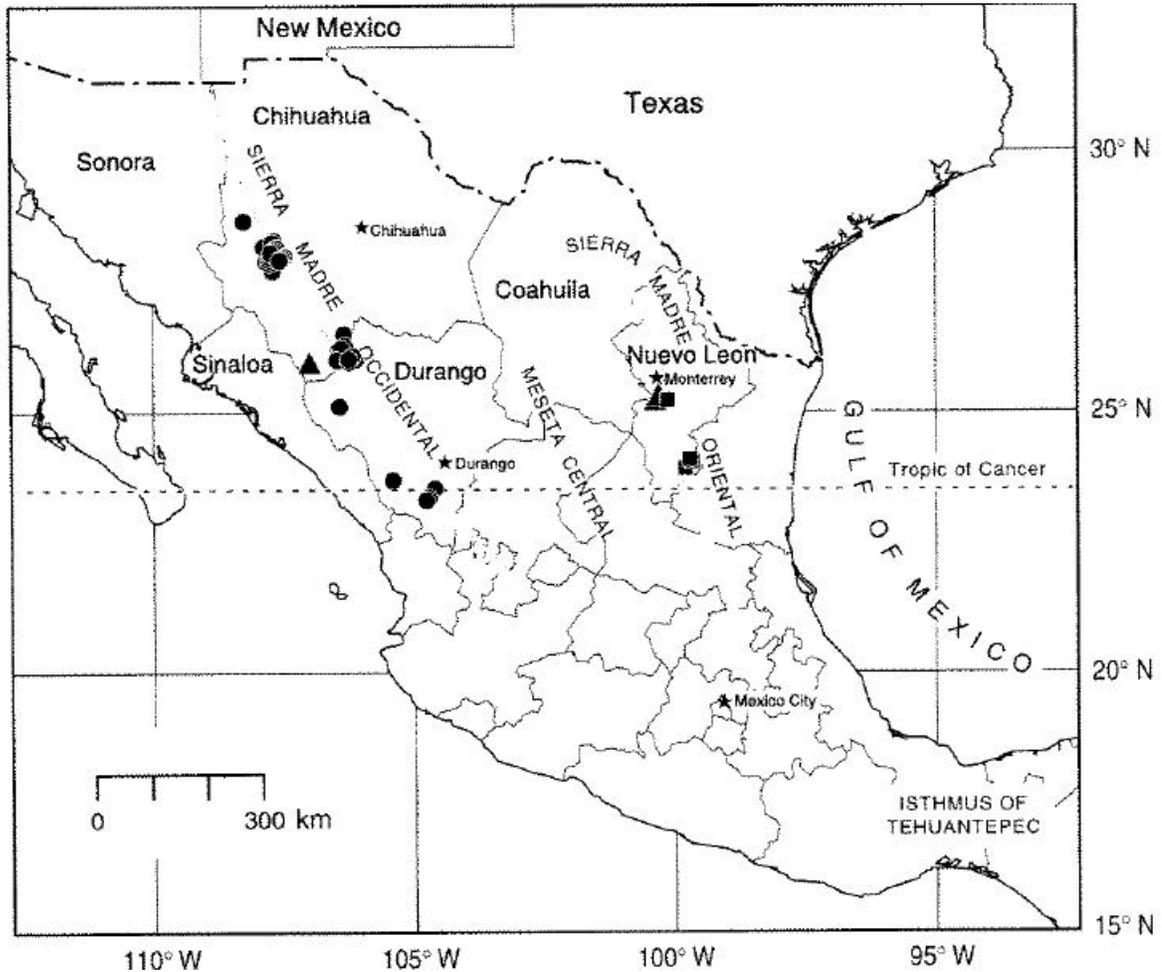


Fig. 2. Mapa mostrando la localización de las especies de *Picea* en México: *Picea chihuahuana* (●), *Picea martinezii* (■) y *Picea engelmannii* var. *mexicana* (▲) (Tomado y modificado de Ledig *et al.*, 2000).

**Hábitat:** *P. chihuahuana* crece naturalmente en altitudes que van de los 2,000 a 3,000 msnm. Se le encuentra en sitios con pendientes muy pronunciadas (20 a 44°) con una temperatura media anual entre los 8 y 12 °C. Las poblaciones están expuestas hacia el Norte (0



Fig. 3. Población de *P. chihuahuana* en su hábitat natural junto al margen del Río Oteros, Chihuahua.

a 47° NE y 0 a 68° NO) y se ubican en los márgenes de los arroyos o ríos, lo que los hace lugares muy húmedos; la distancia máxima entre el límite externo de un paraje y el margen de una corriente de agua es de 250 metros (Gordon, 1968; Ortega, 1997; Sánchez y Cano, 1997) (Figura 3).

**Vegetación asociada:** Se compone principalmente por masas puras de *Pinus arizonica* Engelm., sin embargo existen otras especies de menor abundancia como *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw., *Pinus leiophylla* Schl. y Cham., *Pinus lumholtzi* Rob. y Fer., *Pinus durangensis* Martínez, *Pinus engelmannii* Carr., *Pinus strobiformis* Engelm., *Pseudotsuga flahaultii* Flous., *Quercus* spp., *Abies durangensis* Martínez, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Juniperus deppeana* Steud., *Cupressus lusitanica* Mill. var. *benthamii* (Endl.) Carr., *Populus tremuloides* Michx. y *Arbutus madrensis* M.S. González-Elizondo (Ledig *et al.*, 1997; Narváez, 1984 citado por Sánchez y Cano, 1997; Ledig *et al.*, 2000; Aguirre *et al.*, 2003). Taylor y

Patterson (1980) mencionan también a *Pinus strobiformis* Engelm. como especie frecuentemente asociada a *P. chihuahuana*.

**Evolución:** Wright (1955, citado por Taylor y Patterson, 1980) sugirió el probable origen asiático del género *Picea*, de donde posiblemente por lo menos tres linajes migraran hacia Norteamérica: Linaje *Picea rubens*, Linaje *Picea glauca* y Linaje *Picea chihuahuana*.

El surgimiento de *Picea* pudo ocurrir entre el Período Jurásico y Cretácico, hace más de 100 millones de años, antes de la expansión masiva de los bosques de angiospermas. Hasta hace unos años, muchos taxónomos consideraron que el género evolucionó en Asia debido a que numerosas especies son nativas de Japón y China. En este contexto *P. chihuahuana* o sus ancestros debieron migrar hacia Norteamérica durante el Terciario temprano, en el Paleoceno o el Cretácico tardío, cuando aún existía un intercambio libre entre Asia y Norteamérica, y posteriormente avanzaron hacia el Sur después del Eoceno, posiblemente durante el frío Mioceno (Gordon, 1968; Taylor y Patterson, 1980) (Cuadro 1).

Más recientemente, con base en el registro fósil y evidencias moleculares, se asume que *Picea* tiene un origen boreal en América del Norte, de donde se extendió hacia el sur de Norteamérica y hacia el oeste en Asia, y de Asia hacia Europa. Los fósiles más antiguos (45 millones de años) datan de depósitos de Eoceno Medio encontrados en la Isla Axel Heiberg en el Ártico Canadiense, donde la presencia de tres especies distintas indican que el género ya se había diversificado (LePage, 2001 citado por Ledig *et al.*, 2004), por lo que el origen del género ocurrió probablemente en el Terciario temprano o el Cretácico tardío. Ledig *et al.* (2004) apoyan el origen Norteamericano de *Picea*, debido a que no existen fósiles tan antiguos o mayores de 45 millones de años en Asia o Europa, y éstos son progresivamente más jóvenes conforme fueron moviéndose al oeste de Norteamérica y hacia el sur del Estrecho de Bering.

En Norteamérica, varios fósiles de *Picea* han sido fechados del Eoceno tardío, sin embargo en Asia los únicos fósiles reportados de este mismo período provienen de la Península Kamchatka y la Isla Honshu en la Cuenca del Pacífico, lo cual sugiere que la migración de Norteamérica fue a través de Beringia. La mayoría de los reportes de *Picea* en Asia datan del Oligoceno, Mioceno y Plioceno (LePage, 2001 citado por Ledig *et al.*, 2004).

En Europa todos los fósiles de *Picea* son recientes y datan del Plioceno. En los límites del Eoceno y Oligoceno existieron corredores que pudieron proporcionar un puente de tierra entre al Ártico Canadiense con Europa, sin embargo mientras ese puente estuvo abierto, el clima de Europa fue tropical a subtropical por lo que la diferencia climática debió haber sido una barrera para la dispersión de los taxa boreales norteamericanos. Por lo tanto, se concluye que las piceas europeas descendieron de progenitores asiáticos (LePage y Basinger, 1991 citados por Ledig *et al.*, 2004).

En América del Norte las temperaturas durante el Eoceno medio fueron mucho más cálidas que en la actualidad y gradualmente fue enfriándose hasta descender abruptamente al comienzo del Oligoceno, período donde los precursores de las actuales piceas se movieron hacia el sur; posteriormente, como resultado de la elevación de la Cordillera durante el Mioceno, se expandieron hacia el Suroeste debido a que ésta proporcionó un hábitat montañoso frío (Axelrod, 1990 citado por Ledig *et al.*, 2004). La elevación de la Cordillera coincidió con el surgimiento del Cinturón Volcánico Trans-Mexicano durante el Mioceno y que se continuó durante el Plioceno acompañado de un mayor enfriamiento del clima lo que incrementó el hábitat para este género proporcionando una ruta hacia el sur de México vía la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental (Graham, 1993 citado por Ledig *et al.*, 2004).

Algunos estudios de polen fósil revelan la presencia de *Picea* en el Valle de México durante el Pleistoceno y de manera similar para la región del Istmo de

Tehuantepec durante el Mioceno y Plioceno medio (Clisby y Sears, 1955, Graham, 1972 citados por Ortega, 1997). Basados también en la evidencia de polen fósil, Lozano-García *et al.* (1993, citados por Ledig *et al.*, 2004) mencionan que, en fechas geológicas recientes calculadas en 8, 000 años, *Picea* spp. habitaron por lo menos a 500 Km más allá del sur que las distribuciones actuales de *P. chihuahuana* y *P. martinezii* y aparentemente se retiró hacia el norte por el calentamiento del clima.

Durante los severos períodos interglaciales durante el Cuaternario, el clima se hizo inhabitable para *Picea* en México, y del Peistoceno al presente las poblaciones se fragmentaron. Se considera que *P. mexicana* pudo haber evolucionado como un relicto poblacional de *P. engelmannii* cuando fue aislada durante uno de los eventos interglaciales en el Cuaternario medio (Ledig *et al.*, 1997; 2000; 2004).

Las relaciones evolutivas de *P. chihuahuana* con otras especies no son muy claras. Wright (1955) y Gordon (1968) citados por Taylor y Patterson (1980) sugirieron inicialmente su afinidad cercana con especies del sur de Asia, posiblemente el complejo *P. brachytyla* (Franch.) E. Pritz en China, además de otras especies chinas como *P. asperata* Mast. y *P. likiangensis* (Franch.) E. Pritz. Entre las especies americanas que se consideran más relacionadas están *P. breweriana* S. Watson de Oregon y California y *P. pungens* Engelm., sin embargo los datos comparativos de estas especies con *P. chihuahuana* resultan muy limitados y no se puede asegurar que tengan un ancestro común inmediato (Gordon, 1968; Taylor y Patterson 1980). Jackson y Weng (1999) la relacionaron con la extinta *P. critchfieldii* Jackson & Weng, sp. nov. por el tamaño de los conos de por lo menos 10 cm de longitud. Estimaciones basadas en la distancia genética sugieren que *P. chihuahuana* y *P. martinezii* se aislaron del complejo *P. engelmannii-mexicana* hace 2 millones de años cerca del final del Plioceno (Ledig *et al.*, 2004).

**Categoría de extinción:** *P. chihuahuana* es un relicto endémico del bosque mexicano antiguo situado en la categoría de especie "En Peligro de Extinción (P)" en los listados de la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001 y NOM-059-

SEMARNAT-2010), la cual está definida como “Aquella especie o subespecie cuya área de distribución o tamaño de sus poblaciones en el Territorio Nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros (SEMARNAT, 2002; 2010) (Anexo 3).

De manera similar, la IUCN (versión 2010.4), la sitúa en la categoría “En Peligro (EN)” que se define como “Un taxón...” cuyas poblaciones están reducidas  $\geq 50\%$  al 70% y “...que la probabilidad de extinción en estado silvestre es de por lo menos 20% dentro de 20 años o cinco generaciones...” y “...por consiguiente se considera que se está enfrentando a un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre” (IUCN, 2011)(Anexo 4).

Cuadro 1. Evolución del género *Picea* en la escala del Tiempo Geológico. En letras azules se describe la teoría más reciente de la evolución del género de acuerdo a lo reportado por Ledig *et al.*, 2004.

ERA	ÉPOCA Y PERÍODO (inicio en millones de años)		PLANTAS Y EVENTOS IMPORTANTES	EVOLUCIÓN DE <i>Picea</i>		
				ASIA/EUROPA	NORTEAMÉRICA	MÉXICO
CENOZOICO	CUATERNARIO	Reciente 0.01				
		Pleistoceno 1.9	Extinción de géneros de árboles de zonas templadas en Europa y Norteamérica			Áreas de distribución restringidas hacia el Norte en el Pleistoceno tardío  Evidencia de polen fósil en el Valle de México  Fragmentación de las poblaciones de <i>Picea</i> en México  Evolución de <i>P. mexicana</i> como un relictos de <i>P. engelmannii</i> .
	TERCIARIO	Plioceno 5.1	Diversificación de pastizales; <b>extinción de especies debido al cambio climático en latitudes templadas.</b> Elevación de los Andes	Mayoría de fósiles Europeos  Reporte de fósiles en Asia		Plioceno tardío: aislamiento de <i>P. chihuahuana</i> y <i>P. martinezii</i> del complejo <i>P. engelmannii-mexicana</i>  Plioceno medio: Evidencia polen de <i>Picea</i> en el Paraje Solo del Istmo de Tehuantepec, México

ERA	ÉPOCA Y PERÍODO (INICIO EN MILLONES DE AÑOS)		plantas y eventos importantes	evolución de <i>Picea</i>		
				ASIA	NORTEAMÉRICA	MÉXICO
CENOZOICO	TERCIARIO	Mioceno 25	Establecimiento de los bosques actuales. Pastizales y praderas. Enfriamiento del clima. Emergen los Alpes	Reporte de fósiles en Asia	Posible migración hacia el sur de América	Evidencia de polen fósil en el Istmo de Tehuantepec
		Oligoceno 38	Aparición de bosques templados en latitudes medias	Reporte de fósiles en Asia		
		Eoceno 55	Abundancia de taxa actualmente relictuales y angiospermas ahora extintas	Eoceno tardío: Fósiles en Asia y en islas de la Cuenca del Pacífico que sugieren la migración de <i>Picea</i> de Norteamérica a Asia a través de Beringia	Posible migración de <i>Picea</i> hacia el sur de América  Eoceno tardío: Fósiles más antiguos (45 millones de años) de varias especies de <i>Picea</i> en Norteamérica  Distribución hacia el Sur de Norteamérica	
		Paleoceno 65			Posible migración de <i>Picea</i> hacia Norteamérica  Posible origen del género <i>Picea</i> en América del Norte	

ERA	ÉPOCA y PERÍODO (inicio en millones de años)	PLANTAS Y EVENTOS IMPORTANTES	EVOLUCIÓN DE <i>Picea</i>		
			ASIA	NORTEAMÉRICA	MÉXICO
MESOZOICO	Cretácico 144	Surgimiento y dominancia de Angiospermas en el Cretácico superior	Posible origen de <i>Picea</i> en Asia durante el Cretácico temprano	Posible migración hacia Norteamérica de Linajes <i>Picea rubens</i> , <i>Picea glauca</i> y <i>Picea chihuahuana</i> en el Cretácico tardío  Cretácico tardío: Posible origen del género <i>Picea</i> en América del Norte	
	Jurásico 213	<b>Coníferas ampliamente distribuidas en el mundo.</b> "Edad de las Cícadas"  Clima templado uniforme.	Posible origen de <i>Picea</i> en Asia durante el Jurásico tardío		
	Triásico 248	Surgimiento de las Cicadofitas y Ginkgoales; diversificación de coníferas y helechos. Inicio del rompimiento de la Pangea.	Diversificación de Coníferas		
PALEOZOICO	Pérmico 286	Surgimiento de Voltziales y Coniferales; extinción de los grupos carboníferos, excepto las formas derivadas: licopodios herbáceos, equisetos, glosopteridales en el hemisferio Sur. Formación de la Pangea.	Surgimiento de Coniferales		
	CARBONÍFERO Pensilvánico 320	<b>Expansión de los bosques;</b> helechos con semillas, licopodios arborescentes, helechos, musgos. Glaciación en el hemisferio Sur; colisión de Laurasia y Gondwana, expansión de mares epicontinentales; formación de yacimientos de carbón			

ERA	ÉPOCA y PERÍODO (inicio en millones de años)	PLANTAS Y EVENTOS IMPORTANTES	EVOLUCIÓN DE <i>Picea</i>
CARBONÍFERO	Misisípico 360	Expansión de helechos con semilla, licopodios arborescentes, esfenópsidas, calamites y helechos.	
	Devónico 408	Primeras plantas vasculares; helechos y esfenópsidas primitivas; hepáticas; progimnospermas; primeras plantas con semillas al final del Devónico.	Progimnospermas
	Silúrico 438	Plantas terrestres vasculares simples en el Silúrico medio.	
	Ordovícico 505	Abundantes algas; esporas de las primeras plantas terrestres.	
	Cámbrico 590	Abundantes algas marinas pluricelulares; evidencia de hongos.	
	Precámbrico ~ 4,600	Evidencia de algas procariontes y vida bacteriana por 3.5 billones de años; al final de la era, algas unicelulares eucariontes.	

Modificado de "A Geologic Time Scale" por W.B.Harland *et al.*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982.

**Problemas de extinción:** Las causas de la reducción de sus poblaciones en el pasado se desconocen, sin embargo, se sugiere que uno de los factores pudo ser el que la especie no tuviera tiempo de adaptarse al cambio climático, el cual excedió su capacidad adaptativa, o quizá otras especies mejor adaptadas a las nuevas condiciones la excluyeron por competencia o predación de sus anteriores sitios de distribución (Ledig *et al.*, 1997). Jackson y Weng (1999) mencionan de manera similar que, siendo *Picea critchfieldii* una especie dominante en el sureste de Norteamérica, ésta se extinguió hace aproximadamente 9, 000 años por razones desconocidas, por lo que es muy posible que algunas de las especies de *Picea* de Norteamérica sufran el mismo destino debido al cambio climático global (Miyazawa y Lechowicz, 2004).

En un estudio reciente Wehenkel *et al.* (2011), basados en que, dentro de las poblaciones la diferenciación genética microgeográfica de los individuos con respecto al clima sugiere que éstas podrían adaptarse a ciertas temperaturas a través de cambios en la estructura genética, concluyeron que en las poblaciones estudiadas de *P. chihuahuana* fue posible detectar una respuesta evolutiva al clima, o factor temperatura, que causa la pérdida de diversidad genética en las localidades ubicadas en climas templados. Por lo tanto éstas podrían exhibir una baja estabilidad debido a su baja capacidad adaptativa que podría reflejarse en su actual número de árboles.

Entre los factores más recientes que están influyendo en su extinción se mencionan los siguientes (Gordon, 1968; Bye, 1995; Ledig *et al.*, 1997; Sánchez y Cano, 1997; Ortega, 1997; Ledig *et al.*, 2000; INIFAP, 2011):

- Las poblaciones ocupan un nicho ecológico altamente especializado en la Sierra Madre Occidental.
- La alteración de su hábitat por la explotación intensiva de los bosques de la región de San Juanito-Creel desde principio del siglo XX.
- Daños por el pastoreo de ganado y caprinos, además por incendios.

- Cortas clandestinas para la obtención de celulosa.
- La tala de individuos jóvenes para ser utilizados como árboles de navidad, ya que desde pequeños presentan una forma cónica.
- Muerte por despunte de la copa por causas indeterminadas.
- Infección por muérdago (el porcentaje de árboles infectados se incrementa con la latitud).
- Se requiere de mucho tiempo para alcanzar su madurez sexual.
- La autopolinización puede ocasionar la disminución en el número de semillas, la formación de semillas vacías o bien, semillas llenas pero no viables (Figura 4).

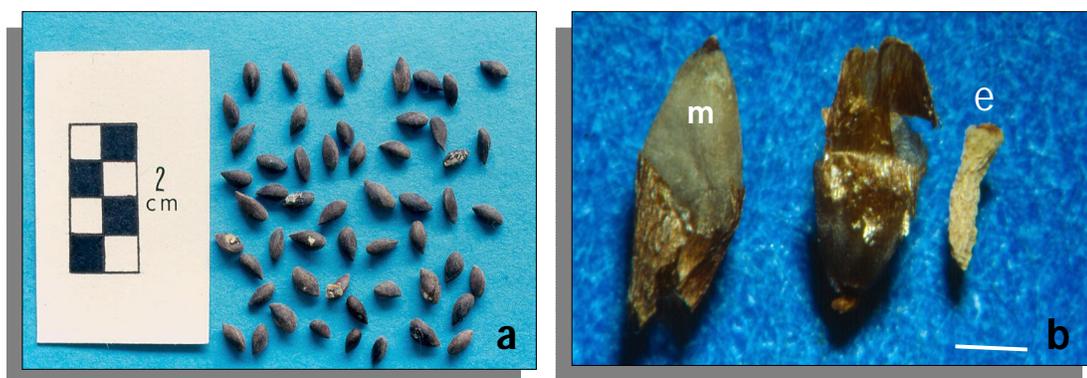


Fig. 4. **a)** Semillas maduras viables de *P. chihuahuana*; **b)** aspecto del megagametofito (m) y del embrión (e) en semillas no viables (Barra=1 mm).

- La falta de agresividad regenerativa reflejada por la baja tasa de individuos jóvenes provocando una distribución heterogénea de edades en las escasas poblaciones.
- Debido a que las poblaciones están geográficamente aisladas, es posible que el flujo genético entre ellas haya desaparecido casi por completo originando la disminución de la variabilidad genética de la especie que la puede llevar a su propia extinción por el alto grado de consanguinidad.

- La reproducción natural de las poblaciones está limitada debido a que del 92 al 95% de los conos son infestados por larvas de la palomilla *Cydia phyllisi* Miller que realiza parte de su ciclo de vida en el eje de los mismos (Figura 5). No obstante que para reducir la densidad de población de la plaga de un año a otro, los conos caídos al suelo se colectan y se queman de noviembre a abril, una vez que éstos han esparcido sus semillas y previo a que emerjan los adultos de la palomilla e inicien un nuevo ciclo de vida, la producción anual de semillas se daña en promedio del 21% afectando la capacidad reproductiva de la especie (Anexo 5).



Fig. 5. **a)** Cono femenino de *P. chihuahuana* infestado de larvas de *Cydia phyllisi* Miller; **b)** las larvas (↑) crecen en el eje del cono y lo perforan hasta alcanzar el interior de las semillas alimentándose del embrión.

**Conservación:** En un proyecto encaminado al desarrollo forestal sostenible, en el año de 1993 el gobierno de Canadá incluyó a México como primer socio internacional en el Programa de los Bosques Modelos, el cual inicialmente consideró dos bosques en nuestro país: el Bosque Modelo Calakmul en la Península de Yucatán en el estado de Campeche y el Bosque Modelo Chihuahua con 110, 000 hectáreas ubicadas en la parte centro-oeste del estado de Chihuahua y al norte de la

cadena montañosa de la Sierra Madre Occidental. Los objetivos del Programa de los Bosques Modelos incluyeron promover el desarrollo sustentable en las prácticas forestales basado en el concepto del manejo integral de los recursos utilizando procedimientos y técnicas innovadores en el manejo de los bosques, a través de asociaciones civiles con representantes del gobierno y del sector industrial de cada región, así como representantes de agrupaciones comunitarias, de los pueblos indígenas, de agrupaciones juveniles y de la comunidad académica (Foro de Bosques Modelos, 1996).

Dentro de las acciones que Bosque Modelo Chihuahua consideró para proteger a *P. chihuahuana* se incluyeron (Bosque Modelo Chihuahua, 1995):

- La conservación del hábitat, preservando las condiciones y el medio ambiente donde mejor se reproducía, como los Parajes El Ranchito y Arareco.
- La reforestación, cultivándola en viveros ubicados en las localidades mencionadas.
- Su protección, cercando las plantaciones para evitar ataques de la fauna, la tala o el vandalismo.
- La educación e información a la comunidad sobre el valor de la especie, así como acerca de las regulaciones existentes para su protección y señalizando los lugares donde se protege y conserva (Figura 6).



Fig. 6. Logotipo del Programa Bosque Modelo Chihuahua, donde se incluye la imagen de *P. chihuahuana* como una especie representativa de la región Tarahumara.

Los estudios en *P. chihuahuana* han sido dirigidos principalmente al conocimiento de las existencias poblacionales, de su distribución, ecología, fenología así como en la detección de los factores principales que afectan a su conservación y supervivencia (Ortega, 1997; García-Arévalo, 2008), sin embargo, el rescate urgente de esta especie, debido a su importancia biogeográfica, biosistemática y forestal, plantea la necesidad de realizar estudios sobre su propagación, ya sea por métodos convencionales, o bien, aplicando técnicas alternativas de propagación como el cultivo de tejidos vegetales, que ha demostrado ser una herramienta biotecnológica útil para otras especies forestales, en virtud de que se logran altas tasas de multiplicación a partir de pequeños fragmentos vegetales, por lo que en el presente estudio se aplicó para explorar sus respuestas morfogénicas.

### **Cultivo de Tejidos Vegetales: una alternativa para la propagación de coníferas**

Las gimnospermas han resultado difíciles de propagar por las vías tradicionales; en cultivos *in vitro* los resultados positivos son escasos al ser comparados con estudios realizados en angiospermas (Hakman y Fowke, 1987; Bonga y von Aderkas, 1992).

Para la mayoría de las coníferas, los métodos convencionales que se utilizan para la propagación vegetativa de especies forestales, como el enraizamiento de esquejes o los injertos, no han resultado exitosos (Thorpe y Harry, 1991). Por otra parte, las técnicas para el desarrollo de plántulas a través del mejoramiento de árboles, requieren de ciclos relativamente largos para la selección y la producción de semillas (Villalobos *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1991).

Para complementar estas técnicas, ha habido una necesidad urgente de desarrollar metodologías efectivas para la regeneración de plantas por medio del cultivo de tejidos (Mathur y Nadgouda, 1999). Las técnicas *in vitro* han sido empleadas para propagar coníferas clonalmente y esto ha podido lograrse por tres vías (Attree *et al.*, 1991; Thorpe y Harry, 1991):

- desarrollo de yemas axilares (yemas preformadas)
- la inducción y desarrollo de brotes adventicios
- la inducción y desarrollo de embriones somáticos.

El desarrollo de yemas axilares y de brotes adventicios ocurre por el proceso de organogénesis, el cual origina estructuras unipolares que posteriormente tendrán que ser enraizadas; mientras que la embriogénesis somática, conduce a la formación de embriones bipolares a través de etapas que pueden ser similares a la embriogénesis cigótica. Las dos últimas vías de regeneración han sido los más utilizados para propagar más de 50 especies de gimnospermas durante las últimas décadas, no obstante, se considera que la regeneración a gran escala no ha sido posible para la mayoría de éstas en la actualidad (Thorpe y Harry, 1991).

### Desarrollo de yemas axilares (yemas preformadas)

Ocurre normalmente en yemas axilares inactivas que son liberadas de la dominancia apical, principalmente por la adición de reguladores del crecimiento como las citocininas a los medios de cultivo. Para la elongación de las yemas axilares se utiliza una pequeña sección del tallo que incluya por lo menos un nudo (Figura 7).

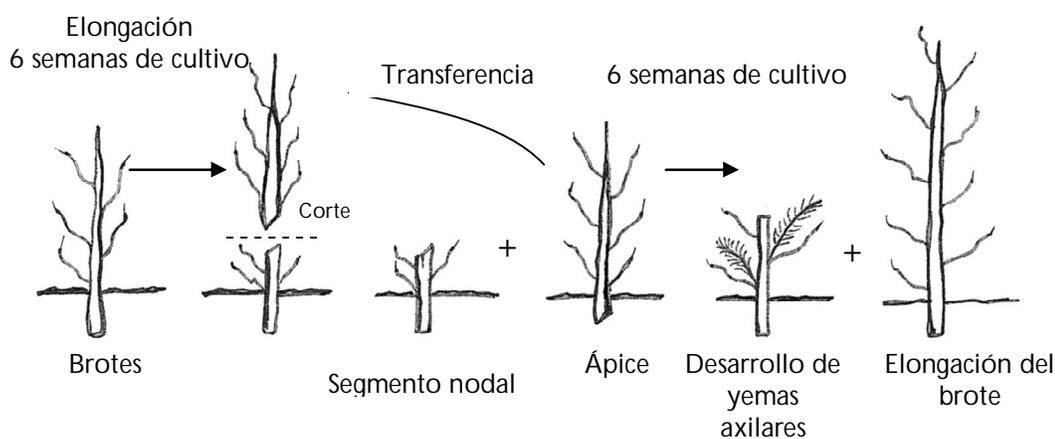


Fig. 7. Estrategia para la multiplicación clonal de brotes en *Pinus caribaea* por el método de desarrollo de yemas axilares (Tomado de Bonga y von Aderkas, 1992).

Este método de propagación se ha utilizado comercialmente de preferencia con árboles de madera dura; en coníferas, tiene poco valor regenerativo y normalmente no se usa, sin embargo, al parecer ha resultado efectivo para *Pinus oocarpa* y *Pinus caribaea* (Baxter *et al.*, 1989, citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

### Inducción y desarrollo de brotes adventicios

En coníferas los brotes son generalmente inducidos directamente del explante, la formación de callo no es usual, sin embargo se ha observado que en

algunas coníferas de edad avanzada la regeneración de los brotes adventicios puede darse a través de una fase de callo, proceso común en angiospermas (Bonga y von Aderkas, 1992).

La obtención de individuos regenerados *in vitro* se puede resumir en cuatro etapas (Thorpe y Harry, 1991):

- inducción de yemas en el explante
- desarrollo y multiplicación de los brotes
- enraizamiento de los brotes
- endurecimiento de las plántulas

Los requerimientos para cada etapa son determinados empíricamente de acuerdo a la especie que se pretende propagar, siguiendo fundamentos básicos que ya han sido establecidos.

La formación de brotes adventicios generalmente requiere de la aplicación combinada de citocininas con auxinas, estas últimas deben utilizarse mesuradamente ya que dosis altas favorecen la aparición de callo o pueden causar anomalías debido a la rápida pérdida de la capacidad regenerativa de los tejidos.

Para la inducción y desarrollo de los brotes comúnmente son aplicadas las citocininas Benciladenina (BA), kinetina (K), 2-isopentiladenina (2iP) y zeatina (Z), siendo las dos últimas de origen natural. La más utilizada ha sido la BA, considerada más activa y químicamente estable, a una concentración aproximada de 25  $\mu\text{M}$  (5.63  $\text{mgL}^{-1}$ ), aunque también se menciona que la mezcla de varias citocininas ha sido benéfica en algunos casos como en *Picea glauca* y *P. mariana* (Thorpe y Harry, 1991).

Las citocininas generalmente son requeridas solamente durante un corto período de inducción. Para inducir las respuestas organogénicas, el tiempo de

exposición a las mismas puede variar desde algunas horas (pulsos) hasta días, semanas y meses dependiendo de la especie estudiada.

La siguiente etapa en la regeneración, involucra la formación de los primordios de brotes, los cuales posteriormente se desarrollarán en brotes con hojas primarias que más tarde se multiplicarán y elongarán. Aunque los primordios pueden continuar su desarrollo en permanencia de BA en el medio, la mayoría de los brotes inhiben su elongación en presencia de las citocininas. Es por esto que en coníferas se requiere de la transferencia de los tejidos a medios de cultivo con los niveles nutricionales modificados y con las citocininas ausentes, además de la presencia de carbón activado, el cual frecuentemente es agregado al medio de subcultivo para remover los restos de reguladores del crecimiento (von Arnold y Hakman, 1988; Bonga y von Aderkas, 1992).

La elongación es un prerrequisito para el enraizamiento de los brotes. Para la mayoría de las coníferas no son necesarios los reguladores del crecimiento en esta etapa, pero sí se requieren varios subcultivos para producir brotes enraizables.

El enraizamiento espontáneo *in vitro* ocurre con frecuencia en algunas leñosas, pero en coníferas es un evento raro. Los brotes generalmente deben someterse a tratamientos con auxinas exógenas para estimular la formación de raíces, las más utilizadas son compuestos sintéticos como el ácido indol butírico (AIB) y el ácido naftalén acético (ANA).

En coníferas, el tratamiento de los brotes recién individualizados con pulsos de altas concentraciones de auxinas seguido por su transferencia a medios libres de reguladores del crecimiento, ha probado ser más eficiente que los tratamientos prolongados con concentraciones bajas. O bien, en árboles de madera dura es común que la fase de inducción y elongación de raíces se realice *ex vitro* para evitar el daño que se les provoca a las raíces cuando se les retira el agar antes de su transferencia a suelo, logrando que la calidad de las raíces y la tasa de enraizamiento sea mayor que cuando se realiza *in vitro*.

Numerosos elementos están involucrados en el enraizamiento *in vitro*: el estrés hídrico, las temperaturas elevadas, la intensidad luminosa reducida, la oxigenación y la presencia de carbón activado son algunos de los factores que estimulan la formación de raíces, al igual que ciertos compuestos químicos que son incrementados en el medio de cultivo tales como el boro, el calcio y el manganeso; con respecto a la sacarosa, algunas especies forman raíces mejor con bajas concentraciones y otras con altas.

La habilidad de los brotes para generar raíces está altamente influenciada por la juvenilidad de los tejidos parentales. La formación de raíces en brotes obtenidos de explantes de árboles maduros ha resultado más difícil que cuando han sido utilizados tejidos de plantas jóvenes.

Las fases de enraizamiento y endurecimiento pueden efectuarse al mismo tiempo o separadas dependiendo si el enraizamiento es llevado a cabo *ex vitro* o *in vitro*. La desventajas de este último es que los brotes *in vitro* muchas veces forman callo en su base, lo que impide una adecuada conexión vascular entre el brote y la raíz (von Arnold y Hakman, 1988; Bonga y von Aderkas, 1992).

Una serie de factores biológicos, químicos y físicos intervienen en el éxito de los cultivos *in vitro*: la selección del explante, los medios nutritivos y las condiciones de incubación.

- Selección del explante

Para obtener la mejor respuesta organogénica *in vitro* se utilizan preferentemente tejidos jóvenes. En coníferas, los embriones cigóticos maduros han sido los más usados como explantes, ya sea completos o alguna de sus partes (cotiledones, hipocótilos y epicótilos), otros tejidos empleados son también los cotiledones y las hojas jóvenes de plántulas germinadas y, con mucho menor

frecuencia, los tejidos obtenidos de árboles jóvenes o maduros (Villalobos, 1985; Attree *et al.*, 1991; Rancillac, 1991; Thorpe y Harry, 1991; Mathur y Nadgauda, 1999).

Como explantes, los embriones han resultado una fuente con buenos resultados debido a que son tejidos meristemáticos por naturaleza y, al cultivarlos *in vitro*, generalmente no requieren una fase de callo para la formación de los brotes adventicios, no obstante, a diferencia de los tejidos jóvenes, los tejidos maduros tendrían la ventaja de provenir de árboles que han mostrado ya su potencial genético (fenotipo) (Villalobos, 1985; von Arnold, 1988).

Bornman (1987), John y Webb (1987) y Ellis y Bilderback (1989) (citados por Bonga y von Aderkas, 1992) mencionan que cotiledones de coníferas cultivados *in vitro* pueden producir otro tipo de estructuras adventicias además de los brotes, tales como pseudobrotes (brotes no desarrollados completamente), protuberancias parecidas a hojas (filoides), nódulos y raíces, entre otras (Figura 8).

Los tejidos provenientes de plantas jóvenes o adultas se usan menos ya que su propagación resulta más difícil, no obstante, se han logrado micropropagar varias coníferas a partir de explantes de plántulas de dos a tres años de edad, y muy pocas a partir de árboles de más edad, como en el caso de *Thuja plicata* de diez años (Coleman y Thorpe 1977, citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

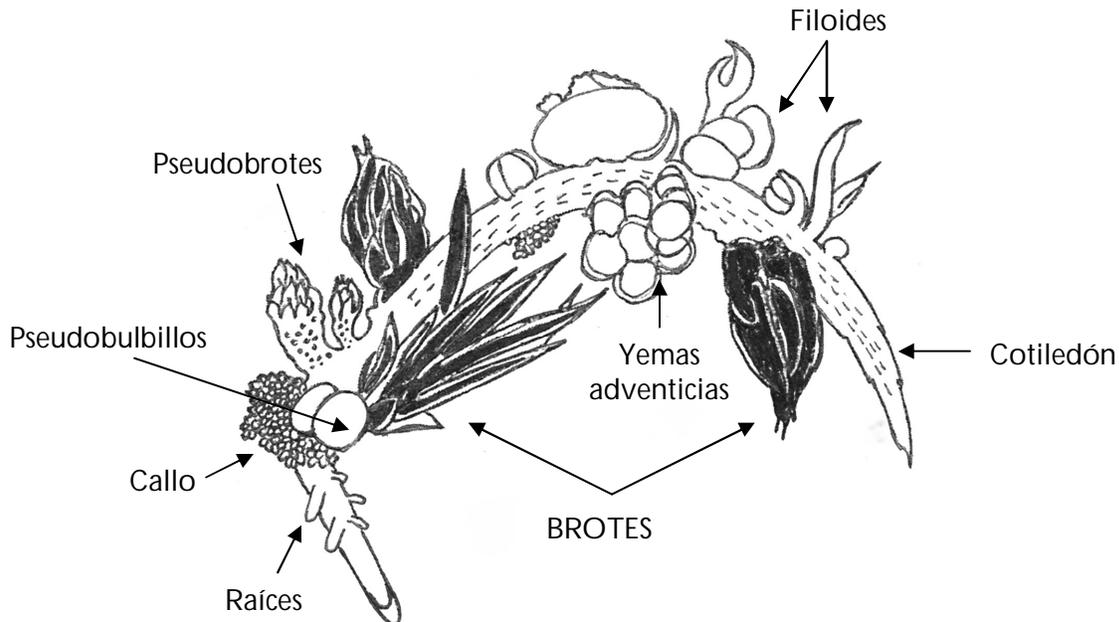


Fig. 8. Representación compuesta de las estructuras adventicias que pueden ser inducidas en cotiledones de coníferas en un medio con reguladores del crecimiento (citocininas y/o auxinas) (Modificado de Bonga y von Aderkas, 1992).

- Medios nutritivos

Los primeros medios nutritivos empleados para el cultivo de tejidos fueron modificaciones de soluciones usadas para cultivos hidropónicos de plantas completas, por ejemplo: las soluciones de Knop, Pfeffer y de Hoagland (George y Sherrington, 1984).

La mayoría de los medios utilizados actualmente son modificaciones de otros anteriores y se han desarrollado por un proceso lento y continuo de ensayo y error. De los 260 medios de cultivo que enlistan George y Sherrington (1984), sólo 39 son originales en su composición; de ellos, el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) es el más popular, y cuya formulación de macroelementos es utilizada para otros 53 medios incluidos en la lista (Bonga y von Aderkas, 1992).

El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) fue formulado para el cultivo de callo de tabaco y su uso ha proporcionado resultados satisfactorios para el cultivo de numerosas especies vegetales con fines de propagación. Sus macronutrientos contienen elevadas concentraciones de nitrógeno en forma de iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en proporciones incrementadas de cinco, quince y hasta diecinueve veces más que otros medios de cultivo. No obstante los macronutrientos incluyen los seis elementos mayores indispensables para el crecimiento de las plantas (N, P, K, Ca, Mg y S), en el medio MS suelen hacerse diluciones que han mostrado ser más eficientes en algunas circunstancias (George y Sherington, 1984). Su uso en coníferas fue reportado por Rancillac para *Pinus pinaster* (1991), sin embargo con este medio generalmente se utilizan los macronutrientos diluidos a  $\frac{1}{2}$  o  $\frac{1}{3}$  de su concentración original (Bonga y von Aderkas, 1992).

El medio B5 fue formulado por Gamborg *et al.* (1968, citado por George y Sherington, 1984) para el cultivo de células en suspensión de soya y ha sido utilizado también para múltiples investigaciones. Su contenido en iones  $\text{NO}_3^-$  es mayor que el de los iones  $\text{NH}_4^+$  debido a que el crecimiento de las células de soya decae en altas concentraciones de amonio. Se han propuesto varias versiones modificadas de este medio para ser utilizadas en monocotiledóneas. Su uso en gimnospermas (Cycadales) fue reportado por Chávez *et al.* (1992a, b y c).

El medio SH fue formulado por Schenk y Hildebrandt (1972) para el cultivo de callo de mono y dicotiledóneas. La concentración iónica final es muy similar a la del medio B5 aunque con niveles ligeramente más altos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y P, ya que concentraciones mayores de estos iones disminuyeron el crecimiento y causaron precipitados. Con este medio examinaron el crecimiento de callo en 37 especies vegetales y se probó que soportó bien su crecimiento en todas excepto en dos casos. También ha sido utilizado ampliamente en leguminosas y coníferas (George y Sherington, 1984; Ellis y Bilderback, 1991; Phillips y Gladfelter, 1991; García, 2003; Galindo, 2004).

La concentración y el balance iónico permiten una mejor comparación entre los medios, ya que entre ellos existen grandes variaciones al respecto, además que para algunas especies o grupos de plantas algunos iones pueden resultar inhibitorios. En tejidos de plantas leñosas cultivados *in vitro* frecuentemente se ha visto que crecen mejor en medios con bajas concentraciones iónicas. En la composición de un medio de cultivo son importantes dos aspectos: 1) la concentración total de nitrógeno en el medio y 2) la proporción de iones nitrato y amonio (George y Sherington, 1984; George *et al.*, 2008). El cuadro 2 muestra la fuerza iónica de los tres medios de cultivo empleados en el presente experimento.

Cuadro 2. Fuerza iónica de tres medios utilizados para el cultivo *in vitro* de coníferas.

Medio	Fuerza iónica (mM)
Murashige y Skoog (MS)	95.8
Gamborg <i>et al.</i> (B5)	61.9
Schenk y Hildebrandt (SH)	67.2

(Tomado y modificado de Bonga y von Aderkas, 1992)

El crecimiento y la morfogénesis en cultivo de tejidos están marcadamente influenciados por la disponibilidad de nitrógeno y la forma en la cual está presente en el medio de cultivo. El nitrato es generalmente considerado la forma más importante de nitrógeno y la mayoría de los medios de cultivo contienen más iones nitrato que amonio. Después de la toma de  $\text{NO}_3^-$  éste es reducido a  $\text{NH}_4^+$  dentro de las células previo a su incorporación en moléculas orgánicas, y esta es la forma en la que las plantas lo utilizan principalmente para sus procesos metabólicos. El suministro de nitrógeno reducido parece beneficiar por lo menos dos procesos involucrados con la división celular como son la síntesis endógena de factores que la promueven y la formación de la pared celular. La razón por la cual el nitrógeno no se suministra simplemente como amonio está en la latente toxicidad de dichos iones

cuando están presentes en altas concentraciones y en la necesidad de controlar el pH del medio, ya que la incorporación de amonio provoca que las células excreten protones (H<sup>+</sup>) hacia el medio haciéndolo más ácido (George y Sherington, 1984; George *et al.*, 2008).

De forma general, el uso de las sales minerales al 100 % de su concentración se emplea sólo para las etapas de iniciación de los brotes adventicios ya que no han resultado siempre óptimas para la continuación de su crecimiento. En etapas posteriores del desarrollo de los brotes se prefieren utilizar diferentes formulaciones, generalmente las sales minerales se reducen al 50% de su concentración debido a que una de las principales fuentes de nitrógeno, el amonio, puede resultar tóxico e inhibitorio. En algunos casos, el amonio ha sido reemplazado completamente o disminuido utilizando una mezcla de fuentes de nitrógeno orgánico, principalmente aminoácidos, y KNO<sub>3</sub>, como nitrógeno inorgánico (Berlyn *et al.*, 1991; Chesick y Bergmann, 1991; Lesney, 1991; Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992). Varias formulaciones de medios nutritivos han sido utilizados para el cultivo *in vitro* de coníferas, en todos los casos se trata de medios de cultivo químicamente definidos (Cuadro 3).

En coníferas, la regeneración de brotes adventicios se ha logrado con mayor éxito en los medios solidificados con agar; los medios líquidos se emplean para el cultivo de células en suspensión, sin embargo, ha sido difícil establecer este tipo de cultivos a partir de células de callo de coníferas cultivadas en medios sólidos y, al parecer, ha sido más fácil desarrollarlos a partir de células derivadas de masas celulares embriogénicas (Villalobos, 1985; Thorpe y Harry, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

En resumen, para la elaboración del medio de cultivo son necesarios una fuente de energía, generalmente sacarosa al 3% (p/v); vitaminas, nitrógeno reducido y reguladores del crecimiento (Thorpe y Harry, 1991).

Cuadro 3. Medios nutritivos utilizados para el cultivo *in vitro* de coníferas.

---

MEDIO	REFERENCIA
<b>AE</b> (von Arnold y Eriksson, 1981) <b>LV</b> (Litvay <i>et al.</i> , 1981) <b>MCM</b>	Bornman, 1983
<b>Heller</b> (1953) <b>Knop modificado</b> por Gautheret (1959) <b>CD</b> (Campbell y Durzan, 1975)	Rancillac, 1991
<b>Sommer <i>et al.</i></b> , (1975) <b>LS modificado</b> por Cheng (1975) <b>SH modificado</b> por Reilly y Washer (1977)	Ellis y Bilderback, 1991
<b>SH</b> (Schenk y Hildebrandt, 1972)	Phillips y Gladfelter, 1991 Chesick y Bergmann, 1991 Rancillac, 1991
<b>GD</b> (Gresshoff y Doy, 1972) <b>Risser y White</b> (1964) modificado por Sommer <i>et al.</i> , 1975 <b>MS</b> (Murashige y Skoog, 1962)	Rancillac, 1991
<b>LP</b> (von Arnold y Eriksson, 1981)	Chesick y Bergmann, 1991 Mathur y Nadgauda, 1999
<b>DCR</b> (Gupta y Durzan, 1985)	Mathur y Nadgauda, 1999
<b>WPM</b> (Lloyd y McCown, 1980)	

---

- Condiciones de incubación

Numerosos factores del ambiente del cultivo influyen el crecimiento y diferenciación. Estos incluyen la forma física del medio (líquido o semisólido), el pH, la luz (fotoperíodo e intensidad), la temperatura, la humedad y la atmósfera gaseosa (Thorpe y Harry, 1991).

La micropropagación de coníferas fue lograda por primera vez en 1975 por Sommer *et al.*, con cultivos de embriones de *Pinus palustris*; desde entonces, las aplicaciones biotecnológicas en coníferas han mejorado considerablemente, sin embargo, en ocasiones el esfuerzo se ha concentrado en muy pocas especies (Harry y Thorpe, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

Harry y Thorpe (1991) reportaron que entre las especies del género *Picea*, la organogénesis había sido lograda con seis especies y la embriogénesis somática con cinco, por lo que se pudo inferir que el género respondió positivamente *in vitro*.

El cuadro 4 muestra algunos ejemplos de coníferas regeneradas por cultivo de tejidos vía obtención de brotes adventicios.

Cuadro 4. Formación de brotes adventicios en algunas coníferas cultivadas *in vitro*

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO DE INDUCCIÓN	REGULADORES DEL CRECIMIENTO (mgL <sup>-1</sup> )	MEDIO DE PROLIFERACIÓN	REFERENCIA
<i>Picea abies</i>	Hojas de árboles jóvenes	LP modificado	BA (2.25)	LP modificado 50%, sin RC	von Arnold y Eriksson, 1979
<i>Picea mariana</i> <i>Picea glauca</i>	Epicótilos (incluyendo hojas primarias)	SH	BA(1.12) + 2iP (1)	SH sin RC	Rumary <i>et al.</i> , 1986
<i>Picea engelmannii</i>	Embriones maduros; cotiledones, hipocótilos y epicótilos de plántulas germinados <i>in vitro</i>	AE ✓ SH LV MCM	BA (2.25)	Medios basales sin RC + 0.1% carbón activado	Harry y Thorpe, 1991
<i>Pinus eldarica</i>	a)Embriones inmaduros; b) cotiledones unidos al epicótilo	MMS	a) K (1) + IBA (0.001) o ANA (0.01) b) K (1) + IBA (0.05)	MMS-0 sin RC	Phillips y Gladfelter, 1991
<i>Pinus oocarpa</i>	a)Embriones maduros; b) cotiledones de plántulas germinados <i>in vitro</i>	MS modificado	a) BA (2.25-11.26) + ANA (10-25 nM) b) BA (5.63) + ANA (25 nM)	MS modificado sin RC	Schwarz <i>et al.</i> , 1991
<i>Pinus strobus</i>	Embriones; cotiledones	SH modificado	BA (1)	SH modificado sin RC	Webb y Flinn, 1991
<i>Pinus baksiana</i>	Embriones maduros	LP ✓ DCR GD ✓ MS SH	BA (1.12-4.5)	Medios basales 50% de sales, sin RC	Chesick y Bergmann, 1991
<i>Pinus caribaea</i>	Embriones maduros	CD	BA (3)	GD 50% de sales + BA (1-3 mgL <sup>-1</sup> )	Berlyn <i>et al.</i> , 1991

RC- reguladores del crecimiento

✓ - medio con la mejor respuesta

Cuadro 4. Continuación...

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO DE INDUCCIÓN	REGULADORES DEL CRECIMIENTO (mgL <sup>-1</sup> )	MEDIO DE PROLIFERACIÓN	REFERENCIA
<i>Pinus elliotii</i>	a) Cotiledones b) Embriones	a) GD b) Risser y White	a) BA (10) b) BA (5)	a) GD 50% de sales, sin RC b) -----	Lesney, 1991
<i>Pinus ponderosa</i>	Embriones maduros	SH modificado al 50% ✓ Sommer <i>et al.</i> , (1975) LS modificado	BA (5)	SH 50% de sales	Ellis y Bilderback, 1991
<i>Pinus pinaster</i>	Embriones maduros	Sommer <i>et al.</i> , 1975 (macroelementos) y MS (microelementos)	BA (2.25)	-----	Rancillac, 1991
<i>Pseudotsuga macrolepis</i>	Embriones maduros	B5 modificado SH	BA (3 y 5) + ANA (0.5 y 0.1)	B5 50% y SH 50% de sales	Galindo-Flores <i>et al.</i> , 1996
<i>Pinus cembroides</i>	Cotiledones de embriones germinados <i>in vitro</i>	GD ✓ SH	BA (1.5) + ANA (0.1)	Medios basales sin RC	Montes y Solis, 1996
<i>Pinus culminicola</i> <i>P. pinceana</i> <i>P. maximartinezii</i> <i>P. strobiformis</i>	Embriones maduros	MS	BA (3-4)	MS 75%	Villalobos y Pérez Molphe Balch, 1996
<i>Pinus wallichiana</i>	Embriones maduros	DCR ✓ SH WPM	Thidiazuron (0.025 µM) BA (0.56)	DCR 50% de sales + 0.05% carbón activado	Mathur y Nadgauda, 1999
<i>Pinus heldreichii</i>	Embriones	GD modificado ✓ LP modificado MS	BA (1)	Medios basales 50% de sales, sin RC	Stojičić <i>et al.</i> , 1999

RC- reguladores del crecimiento

✓ - medio con la mejor respuesta



### Inducción y desarrollo de embriones somáticos

La embriogénesis somática, adventicia o asexual, es el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética. Fue reportada por primera vez para gimnospermas en cultivos de embriones inmaduros de *Picea abies* por Hakman *et al.*, en 1985 (Attree *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

Entre más juvenil es el material biológico, más fácil será inducir la embriogénesis. William y Maheshwaran (1986) postularon que en un embrión joven, numerosas células ya están “determinadas” a seguir el desarrollo embriogénico. Conforme el embrión madura y germina, el número de células que pueden formar embriones decrece y, como consecuencia, la capacidad de formar embriones somáticos también disminuye (Bonga y von Aderkas, 1992).

Otra explicación del origen de la embriogénesis somática es la poliembrionía, la cual ocurre de manera natural y frecuente en las coníferas. Puede ser de dos tipos: la poliembrionía por segmentación (cleavage) y la poliembrionía simple. La primera, describe la condición donde un proembrión en desarrollo se segmenta para formar varios embriones competentes (Attree *et al.*, 1991); la poliembrionía simple, es el resultado de la fertilización de más de una célula huevo dentro de un único óvulo que lleva al desarrollo inicial de embriones cigóticos múltiples con diferentes genotipos (Singh, 1978 citado por Garin *et al.*, 1998). Generalmente, sólo uno de los embriones cigóticos es dominante, pero los embriones subordinados pueden permanecer viables y es de este modo que los tejidos embriogénicos pueden originarse a partir de uno o más embriones cigóticos subordinados (Becwar *et al.*, 1991 citado por Garin *et al.*, 1998).

Por lo anterior, el éxito de la embriogénesis somática se debe en gran parte al uso de embriones cigóticos inmaduros. Este proceso generalmente requiere de la inducción del llamado “callo embriogénico”, que consiste en una masa de células blancas y mucilaginosas que forman a los embriones somáticos, y es referida

generalmente como "callo", sin embargo, este término es inapropiado debido a que los tejidos están compuestos de numerosos embriones y suspensores (Bonga y von Aderkas, 1992).

En las especies del género *Pinus* la formación de tejido embriogénico al parecer está restringido a los embriones inmaduros, mientras que en el género *Picea* ha sido obtenido tanto de embriones maduros como inmaduros. La restricción a la formación de embriones somáticos a partir de embriones inmaduros puede estar relacionada con el origen del tejido embriogénico, ya que en *Pinus* éste se origina de la región del suspensor, mientras que en *Picea* se deriva de la región del hipocótilo-cotiledones de embriones maduros e inmaduros (Garin *et al.*, 1998).

La embriogénesis somática ocurre generalmente en presencia de reguladores del crecimiento, particularmente con auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ANA. Una vez que se ha formado el callo embriogénico, si éste es estable, puede ser mantenido indefinidamente por subcultivos; posteriormente, la maduración de los embriones necesitará de su transferencia a un medio sin auxinas y la adición de ácido abscísico (ABA).

La obtención de plantas por esta vía es la ruta preferida, debido a la dificultad y el tiempo empleado con el enraizamiento de brotes derivados de forma adventicia, por lo que al mismo tiempo los costos de producción se reducen; además proporciona un método rápido y efectivo para la propagación de un gran número de plantas, con la ventaja de que los embriones somáticos pueden ser almacenados relativamente fácil en cultivos líquidos. Entre otras ventajas se menciona que la técnica representa un método verdadero para obtener el rejuvenecimiento de árboles maduros y que las suspensiones obtenidas del callo embriogénico podrían servir como una fuente de protoplastos embriogénicos para ser usados en la ingeniería genética de árboles (Thorpe y Harry, 1991).

Una de las desventajas de usar embriones inmaduros radica en su disponibilidad estacional, además que resultan difíciles de extraer debido a su

diminuto tamaño. No obstante que las ventajas parecen ser mayores que las desventajas, algunos estudios han mostrado que la capacidad de los embriones cigóticos para iniciar la embriogénesis somática en coníferas es muy variable entre individuos y familias y, desafortunadamente, está a menudo restringida a un número pequeño de genotipos, como en *Picea glauca* y *Pinus elliottii* donde, para diferentes genotipos, se encontraron diferencias en las frecuencias de inducción de tejido embriogénico (Webb *et al.*, 1989, Jain *et al.*, 1989 citados por Bonga y von Aderkas, 1992).

Mientras que el número de especies que pueden ser propagadas por este método se ha incrementado, el porcentaje de plantas recuperadas aún permanece bajo. En *Picea abies* se ha estimado que sólo el 1% de los embriones inducidos se desarrollan en plantas (Thorpe y Harry, 1991).

### **Estudios histológicos en coníferas**

Debido a que las gimnospermas como grupo han mostrado menor facilidad al cultivo *in vitro*, ha sido necesario redoblar esfuerzos para determinar cuáles son las condiciones óptimas que permiten la multiplicación masiva de estas especies.

Si las perspectivas a futuro para su propagación constituyen la aplicación exitosa de las técnicas de cultivo de tejidos, es importante tener un mayor conocimiento de su desarrollo *in vitro*, sobre todo de los primeros eventos de diferenciación (Villalobos, 1985).

Los cambios estructurales durante la organogénesis en cultivo de tejidos son la manifestación de una serie de procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos (Thorpe, 1980, citado por Patel y Berlyn, 1983), sin embargo, hasta la fecha uno de los principales problemas ha sido descifrar los mecanismos por los cuales las células, ya sean meristemáticas o parenquimáticas, logran especializarse en distintos tipos de células y tejidos durante las sucesivas etapas del desarrollo de una planta. El estudio

de los eventos asociados al crecimiento y diferenciación celular puede ser realizado a nivel fisiológico, bioquímico y estructural (Thorpe y Kumar, 1993).

Los métodos histológicos han contribuido significativamente al entendimiento de los sistemas de los cultivos *in vitro*. Las capacidades regenerativas de un tejido pueden ser identificadas con anticipación, desde su inicio, con estudios histológicos basados en los cambios anatómicos y complementados con otros estudios (Wann *et al.*, 1987; Ellis y Bilderback, 1989), de esta manera es posible determinar el desarrollo ontogénico de las estructuras regeneradas, el tejido de origen y la etapa en que resulta competente para la morfogénesis.

De acuerdo con Thorpe y Kumar (1993) los eventos tempranos de la organogénesis pueden ser divididos en tres fases dependiendo de la respuesta de los tejidos cultivados:

1. Pre-inducción (obtención de la competencia)
2. Inducción (determinación)
3. Post-inducción (expresión)

La competencia fue definida por Christianson y Warnick (1985, citados por Ellis y Bilderback, 1989) como la habilidad de los tejidos para responder a una inducción organogénica; cuando las células son competentes, pueden ser inducidas a seguir una determinada ruta morfogenética. La obtención de la competencia por las células de los tejidos es comparable a la desdiferenciación, sin embargo, esto no necesariamente involucra la proliferación de células que producirán un callo desorganizado. La inducción es lograda por estímulos externos tales como los reguladores del crecimiento en el medio y/o un balance entre los niveles exógenos y endógenos de los mismos. Las etapas de pre-inducción (competencia) e inducción (determinación) no se reflejan siempre como cambios morfológicos en el explante. Al final de la fase de inducción un tejido determinado puede expresar la morfogénesis, por ejemplo la diferenciación de primordios de brotes, aún si es

transferido del medio de inducción a un medio basal sin reguladores del crecimiento.

La mayoría de las investigaciones en organogénesis en cultivo de tejidos están relacionadas con la manipulación de la fuente de tejido, la composición del medio y los factores ambientales (Thorpe, 1980, citado por Patel y Berlyn, 1983). Aunque los procesos que intervienen en la morfogénesis han sido escasamente estudiados en angiospermas a nivel estructural, metabólico y molecular, los estudios en gimnospermas y otras leñosas han sido aún más limitados.

Entre los primeros trabajos que describen los cambios morfológicos y estructurales en coníferas están los realizados por Cheah y Cheng (1978) quienes reportaron el análisis histológico del proceso del desarrollo de los brotes adventicios en cotiledones de *Pseudotsuga menziesii*. Identificaron que la proliferación de nuevas células ocurría principalmente en las capas hipodérmicas del cotiledón y observaron que el desarrollo de los brotes se caracterizó por la aparición secuencial de cuatro estructuras anatómicas: meristemoides, primordios de brotes, ápice del brote con primordios de hojas y brotes adventicios.

En 1979, von Arnold y Eriksson estudiaron la influencia de la longitud de las hojas en la respuesta organogénica y reportaron de manera breve que después de dos semanas de cultivar *in vitro* hojas cortas (1-3 mm) de *Picea abies* en presencia de BA su estructura interna no cambió mucho, sólo algunas células del mesófilo presentaron citoplasma abundante, y que posteriormente se formaron regiones meristemáticas situadas en la capa externa del mesófilo, lugar de donde surgieron los primordios de brotes.

Basados en el estudio anterior Jansson y Bornman (1981) hicieron una comparación del potencial regenerativo de hojas de diferentes edades en *Picea abies*, con énfasis en el estado de diferenciación de la zona de abscisión. Reportaron que las primeras divisiones posiblemente ocurrieron en capas epidérmicas así como en capas subepidérmicas. Observaron que las divisiones que dieron origen a las

estructuras adventicias surgieron de células epidérmicas en la región distal a la zona de abscisión, mientras que las células de la hipodermis contribuyeron solamente en la región cercana a la zona de abscisión de las hojas jóvenes. Concluyeron que, en términos de iniciación de estructuras adventicias, la respuesta decrece progresivamente con la edad de la hoja y con la distancia de la zona de abscisión hacia el ápice.

Miscroscopia electrónica de barrido fue utilizada para estudiar los detalles estructurales asociados con la formación de brotes en cotiledones del abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Las características estructurales de los brotes en etapas tempranas en el medio de inducción fueron comparadas con las primeras etapas en cultivos de callos con la finalidad de definir el efecto de los reguladores del crecimiento en el control de la morfogénesis.

En los cultivos de inducción de brotes, los reguladores del crecimiento causaron proliferación celular en las regiones hipodérmicas del cotiledón que pudieron ser reconocidos como primordios de brotes después de dos semanas de cultivo los cuales emergieron rompiendo las células de la epidermis. En general, las células epidérmicas no mostraron evidencia de divisiones o elongación y su estructura fue mantenida. En cambio, en cultivos de callos, las divisiones celulares fueron azarosas en la región del mesófilo e hipodermis (Kirby y Schalk, 1982).

Los eventos citoquímicos asociados con la formación de brotes múltiples en cultivos de embriones de *Pinus coulteri* fueron reportados por Patel y Berlyn (1983). Ellos establecieron la presencia de dominios organogénicos como grupos de células fácilmente distinguibles del resto de las células del callo debido a que eran pequeñas, con núcleo y citoplasma que se teñían intensamente y de vacuolización limitada.

Uno de los trabajos más descriptivos es posiblemente el que realizaron Villalobos *et al.* (1985) en cotiledones de *Pinus radiata*. El análisis histológico indicó que los primeros cambios fueron observados durante las primeras 24 horas de cultivo. Durante los primeros cinco días ya se distinguieron los patrones de división

celular que llevaron a la formación de estructuras organizadas en la región subepidérmica de los cotiledones. Las observaciones hechas en este estudio establecieron que el desarrollo *in vitro* organizado comenzó con cambios en una sola célula subepidérmica que se dividió en dirección periclinal para dar lugar a dos células hijas. Posteriormente éstas se dividieron anticlinalmente resultando en una estructura de cuatro células. Dichas estructuras organizadas aumentaron de tamaño como resultado de la actividad mitótica formando grupos de seis a ocho células con características particulares a las que los autores denominaron "promeristemoides". Los promeristemoides presentaron células con núcleos prominentes y citoplasma denso, pero a diferencia de las células que los rodeaban estas estructuras estuvieron delimitadas por paredes celulares gruesas y el contacto entre células presentó el mínimo de espacios intercelulares con numerosos plasmodesmos. Los promeristemoides fueron las entidades precursoras de los meristemoides, estos últimos definidos von Arnold (1988) como sitios de crecimiento activo o nódulos de tejido no diferenciado a partir de los cuales surgen nuevas células o estructuras adventicias. Los meristemoides darán lugar a su vez a los primordios de brotes, y éstos, a los brotes adventicios. El análisis histológico de los eventos del desarrollo que se presentan durante la formación de brotes adventicios en epicótilos cultivados *in vitro* de *Picea mariana* y *P. glauca* reveló que, en ambas especies, las divisiones celulares ocurrieron también en las capas subepidérmicas del explante que llevaron a la formación de meristemoides y posteriormente de brotes adventicios intercotiledonarios (Rumary *et al.*, 1986).

En *Pinus eldarica* fue posible la obtención de brotes a partir de callos de seis a 36 meses de cultivo, lo que demostró que que estos tejidos pueden ser competentes para la inducción de regenerantes *de novo*. La organización *de novo* ocurrió por debajo de la superficie del callo observándose planos de división celular no azarosos y la adición progresiva de células especializadas además de sistema vascular en patrones morfológicos reconocibles (Wagley *et al.*, 1987).

El tiempo mínimo que necesitaron los cotiledones de *Pinus strobus* para promover la respuesta caulogénica fue de tres a cuatro días en medio con BA. Flinn *et al.* (1988) y Webb y Flinn (1991) demostraron que grupos de tres a cuatro células estuvieron presentes al cuarto día en presencia o ausencia de la citocinina, pero el número de grupos celulares se incrementó en presencia de la BA y que posteriormente se desarrollaron en grupos de cinco a seis células similares a los promeristemoides descritos por Villalobos *et al.* (1985), la aparición de estos últimos elevó la determinación de brotes. En este estudio los autores sugirieron que las estructuras de tres a cuatro células actuaron como “células blanco” para las citocininas ya que en su ausencia desaparecieron, pero su desarrollo continuó en su presencia. Por otra parte, de manera similar a lo planteado por Villalobos *et al.* (1985), consideraron a los promeristemoides como estructuras “plásticas” en el desarrollo, a diferencia de los meristemoides a las cuales consideraron como estructuras celulares “determinadas”.

Los cambios temporales que ocurrieron durante la maduración de los tejidos y la pérdida de la competencia en embriones de *Pinus ponderosa* fueron estudiados por Ellis y Bilderback (1989, 1991). La respuesta organogénica ocurrió en los cotiledones que estuvieron en contacto con el medio. Para la iniciación de los brotes los cotiledones tuvieron que ser expuestos a la BA por lo menos tres días y exposiciones mayores a siete días no incrementaron significativamente el número de brotes. Se refirieron a los “meristemoides” como estructuras nodulares discretas de origen subepidérmico que siempre precedieron a la formación del brote y que citológicamente consistieron de células isodiamétricas altamente citoplásmicas.

En *Pinus oocarpa* la formación de brotes ocurrió sobre toda la superficie de los cotiledones cultivados *in vitro*. La secuencia de eventos ontogénicos que llevaron a la formación de brotes adventicios los reportan como similares a los descritos para otras coníferas (Schwarz *et al.*, 1991).

Finalmente, breves descripciones de observaciones histológicas son las que realizaron Tang *et al.* (1998) para la organogénesis a partir de callos en *Pinus taeda* quienes demostraron que los meristemas adventicios se formaron después de siete a diez días en el cultivo de diferenciación; y las realizadas por Mathur y Nadgauda (1999) quienes reportaron que los brotes adventicios se iniciaron de los tejidos superficiales de los embriones.

### **Estudios *in vitro* realizados en *Picea chihuahuana***

Los estudios publicados de cultivo de tejidos en *Picea chihuahuana* son escasos. Es probable que el primer trabajo haya sido el realizado por Chaparro (1992), donde obtuvo callo a partir del cultivo de acículas y determinó el mejor medio para el desarrollo de plántulas a partir de embriones maduros.

Montes (1993) obtuvo brotes a partir del cultivo de embriones en medio MS adicionado con BA/ANA (5/0.2 mgL<sup>-1</sup>) realizó subcultivos mensuales en medio basal Gresshoff y Doy (GD). Aunque logró el enraizamiento, no reportó el porcentaje de brotes con raíces obtenido, los cuales al parecer finalmente no prosperaron (Montes, comunicación personal), confirmó que la formación de raíces y la sobrevivencia de las plántulas en esta especie es un proceso difícil.

Posteriormente se realizaron otros estudios, que abajo se describen, derivados del proyecto "Morfogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez Gymnospermae, especie en peligro de extinción" realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, y al cual pertenece el presente trabajo de investigación.

A partir de embriones inmaduros fue inducida la formación de brotes adventicios, mismos que se regeneraron principalmente en los cotiledones en un amplio rango de concentraciones hormonales, siendo la K (5 mgL<sup>-1</sup>) más efectiva que la BA y, donde la presencia de auxinas no fue relevante para este proceso. El

desarrollo y la elongación de los brotes se vio favorecido con la reducción de la concentración de sacarosa y la dilución del medio SH al 50% de su concentración (Mata, 2000).

Realizó también algunos estudios fisiológicos sobre la actividad fotosintética de los brotes en relación al contenido de sacarosa en el medio de cultivo, encontró que aquellos brotes cultivados en medio con una menor concentración de sacarosa de 15 a 10 gL<sup>-1</sup> presentaron mayor contenido de clorofilas y por lo tanto mayor actividad fotosintética, lo que implicó que los brotes estuvieran adquiriendo una condición fotomixotrófica, aumentando su capacidad para fijar CO<sub>2</sub> para promover su crecimiento. Determinó además que existió una respuesta diferencial en el número de brotes formados por embrión dependiendo de la localidad de procedencia de las semillas (Mata *et al.*, 2001).

Paralelamente, también se reportó el cultivo de embriones cigóticos maduros en medio de inducción B5 modificado adicionado de las citocininas BA o K, solas o combinadas respectivamente con las auxinas ANA o 2,4-D en diferentes concentraciones y tiempos de inducción. El objetivo fue determinar el tiempo de menor o mayor competencia organogénica así como definir histológicamente el origen y desarrollo de brotes (López, 2000; López-Escamilla *et al.*, 2000).

En este trabajo, el tiempo mínimo para la inducción de brotes con K fue de 14 días, y con BA 17 días. Después de transcurrido cada tiempo de inducción, los explantes fueron transferidos a medio B5 modificado sin reguladores del crecimiento para promover la proliferación de los brotes inducidos donde permanecían 30 días, y posteriormente fueron transferidos a medio SH al 50 % de su concentración como medio de elongación. El promedio de brotes por embrión fue mayor en K (cinco a siete) que con BA (tres a cinco) también en ausencia de auxinas.

El análisis histológico reveló la presencia de agrupaciones de tres o cuatro células de origen subepidérmico que posiblemente fueron precursoras a la

formación de brotes. Pruebas bioquímicas indicaron que la K promovió una mayor síntesis de proteínas durante la formación de los brotes a diferencia de la BA.

El cultivo de embriones maduros de *P. chihuahuana* procedentes de cuatro diferentes poblaciones y de distintos tiempos de colecta, fue explorado con el fin de determinar si existían diferencias en el número de brotes producidos. Fue posible encontrar diferencias significativas en el número de brotes por embrión en función de la localidad de procedencia de las semillas, además se observó que las semillas almacenadas por tres años presentaron mejores respuestas morfogénicas que aquellas almacenadas por cinco años (Sánchez, 2001).

Debido a que en los experimentos previos el enraizamiento de los brotes fue una gran limitante para que los brotes producidos continuaran su desarrollo *ex vitro*, exploró también la utilización del medio de enraizamiento y elongación propuesto por Dumas y Moteuuris (1995, citados por Sánchez, 2001) siendo éste más efectivo que los ensayos reportados por Mata (2000) y López (2000).

Dado que *Picea chihuahuana* es una especie endémica, muy restringida geográficamente, el interés que se ha generado por estudiarla es relativamente reciente y por lo tanto los estudios acerca de su propagación aún pueden considerarse escasos. Es por esto que todas aquellas investigaciones que se realicen para ayudar al entendimiento de los procesos que conduzcan a la regeneración exitosa de esta y otras especies en peligro de extinción poco estudiadas siempre serán importantes contribuciones en la búsqueda de la recuperación poblacional de la especie.

## JUSTIFICACIÓN

*Picea chihuahuana* Martínez es considerada un relicto endémico de los bosques de coníferas en México y no obstante su importancia ecológica, evolutiva, cultural y genética, sus escasas poblaciones son destruidas por la tala ilegal, además de la alteración de su hábitat y los efectos del cambio climático. Su crítica situación se agrava debido a su limitada capacidad reproductiva causada por la baja producción de semillas viables, el escaso número de individuos que albergan sus poblaciones, su restringida distribución geográfica, y a su largo y lento ciclo de vida, que en conjunto la sitúan como especie en Peligro de Extinción. Resulta entonces necesario proponer nuevas vías de propagación como una alternativa para la conservación de esta especie, así como la realización de los estudios necesarios que conduzcan al mejor entendimiento de los eventos morfogénéticos, fisiológicos e histológicos que permitan la obtención de un mayor número de individuos regenerados.



## OBJETIVOS

### GENERAL

Establecer condiciones de cultivo *in vitro* para la inducción de respuestas morfogénéticas en *Picea chihuahuana*.

### PARTICULARES

Obtener brotes adventicios a partir de embriones cigóticos de semillas maduras de *P. chihuahuana*.

Realizar el análisis estructural para determinar la identidad y los cambios ontogénicos de los brotes regenerados *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo de Tejidos

#### Material biológico

Se utilizaron semillas maduras de *Picea chihuahuana* procedentes del Paraje "El Ranchito", Municipio de Bocoyna, Chihuahua, colectadas en el año de 1993 (ensayos 1 y 2), y en 1993 y 1997 (ensayo 3). Las semillas fueron donadas por Bosque Modelo Chihuahua, A.C.

#### Desinfección del material biológico

Las semillas se limpiaron eliminando los restos de las estructuras aladas y resina y se seleccionaron aquellas que no presentaron daños en su cubierta seminal; éstas fueron lavadas con tres gotas de Tween 80 en 50 mL de agua destilada agitándolas diez minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada antes de ser sometidas a un tratamiento con bactericida comercial (Microdyn, 33% de plata coloidal) tres gotas por cada 50 mL de solución durante 20 minutos en agitación constante. Después se desinfectaron dos minutos en etanol 70% y 20 minutos con solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) (6% de cloro activo) en agitación, finalmente se lavaron con peróxido de hidrógeno (agua oxigenada comercial) al 30% (v/v) durante 30 minutos.

En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Antes de extraer los embriones cigóticos maduros, las semillas fueron remojadas en agua destilada esterilizada 24 horas a 4 °C para suavizar la cubierta seminal y eliminar las semillas vacías que flotaron en la superficie. Al siguiente día se sometieron nuevamente a tres enjuagues con agua destilada esterilizada antes de ser removida su cubierta seminal y disecar los embriones, previo a la siembra éstos fueron remojados con una solución antioxidante y sembrados horizontalmente en medio de cultivo en frascos Gerber® (capacidad 120 mL) (Figura 9).

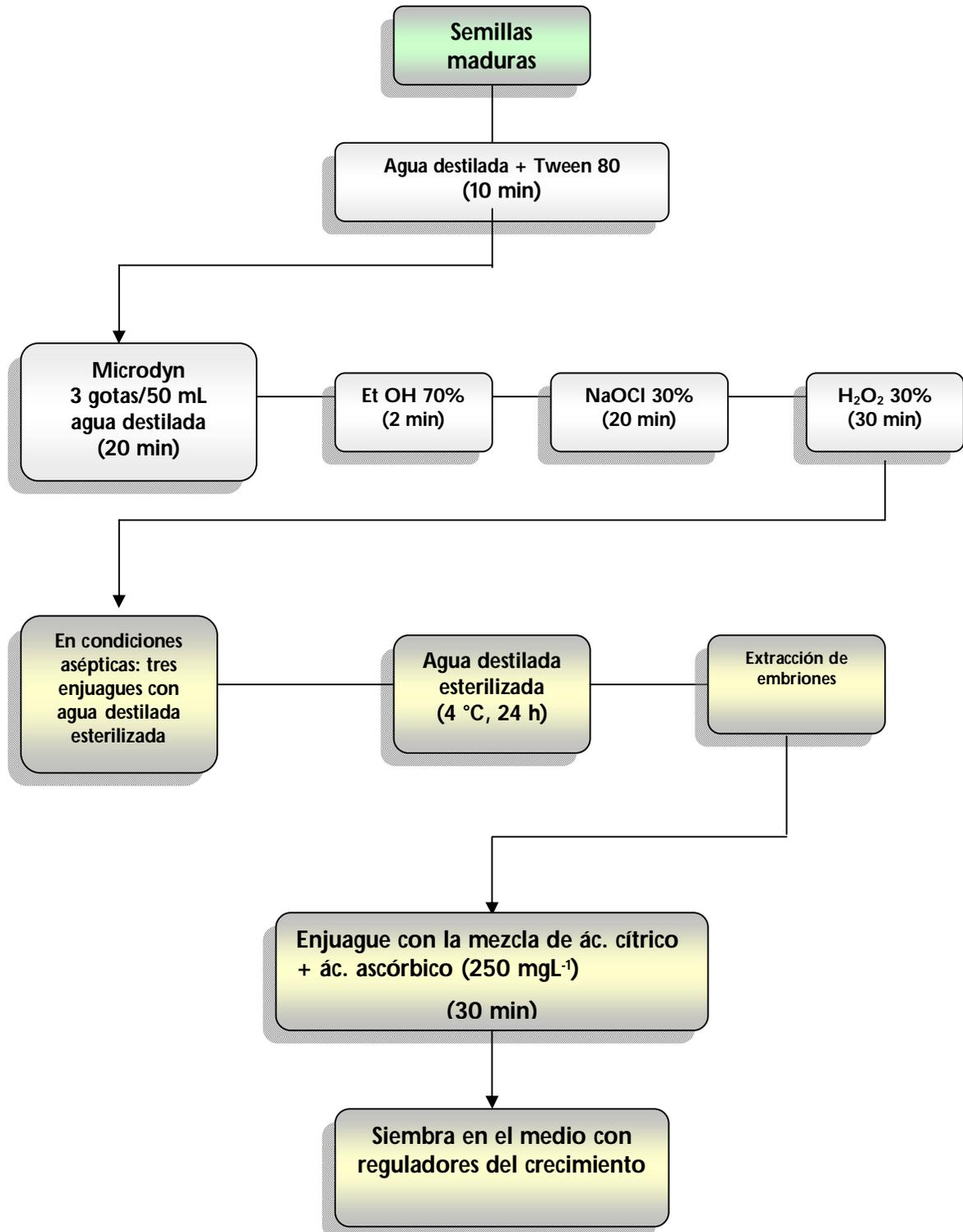


Fig. 9. Procedimiento para la desinfección y siembra de semillas maduras de *P. chihuahuana*.

## Medios de cultivo y condiciones de incubación

Con el fin de establecer la metodología adecuada para la obtención de brotes en *Picea chihuahuana* se realizaron tres ensayos resumidos en el Cuadro 5.

### Ensayo 1

El **medio de inducción** de brotes fue el B5 modificado por Litz (Chávez *et al.*, 1992 a, b, c) con sacarosa 60 gL<sup>-1</sup> y agar bacteriológico (Bioxon) 9 gL<sup>-1</sup> (Anexo 6.1).

Para inducir las diferentes respuestas morfogénicas se adicionaron reguladores del crecimiento (RC): las citocininas 6-Bencilaminopurina (BA) y Kinetina (K) en concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mgL<sup>-1</sup>, combinadas respectivamente con las auxinas Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en las concentraciones 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 y 4 mgL<sup>-1</sup>, haciendo un total de 49 tratamientos. Para cada serie de RC los cultivos fueron mantenidos en luz (fotoperíodo 16 horas luz/8 horas oscuridad) a 40.5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (3000 lux) y en oscuridad constante. Debido a la disponibilidad del material biológico, y por tratarse de ensayos para la exploración de las respuestas morfogénicas, solo se sembraron cinco embriones por tratamiento. Los explantes permanecieron 75 días en el medio de inducción y posteriormente fueron transferidos a medio B5 modificado al 50% de todos sus componentes inorgánicos y orgánicos, sin reguladores del crecimiento, pero con sacarosa 60 gL<sup>-1</sup>. Los subcultivos en este mismo medio se realizaron cada cuatro semanas.

Para este ensayo se utilizaron semillas del Paraje "El Ranchito", colectadas en el año de 1993.

### Ensayo 2

En el segundo ensayo se utilizaron como **medios de inducción**, además del B5 modificado por Litz, el medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972, modificado por Reilly y Washer, 1977) (Anexo 6.2) y el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Anexo 6.3).

Para promover la formación de un mayor número de brotes adventicios se emplearon sólo las dos mejores combinaciones de cada serie de reguladores del crecimiento que fueron determinadas previamente en el ensayo 1: BA/ANA (5/0 y 5/0.5 mgL<sup>-1</sup>) y K/2,4-D (5/0 y 5/0.1 mgL<sup>-1</sup>), además del tratamiento testigo (0/0). Para todos los medios se empleó agar-agar (Merck®) 5.5 gL<sup>-1</sup>; para el medio B5 modificado se adicionó sacarosa 60 gL<sup>-1</sup> y para el SH y MS sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>.

El **medio de proliferación** de brotes fue el SH al 50% en la concentración de todos sus componentes (SH 50%), sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> y sin reguladores del crecimiento.

Los medios de cultivo de inducción y de proliferación fueron adicionados con una solución antioxidante compuesta de la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico, ambos en una concentración de 250 mgL<sup>-1</sup>, pH 5.8, que fue esterilizada e incorporada al medio por filtración (membranas Millipore® de 0.45 µm).

Fueron colocados diez embriones por frasco de cultivo, el experimento fue repetido dos veces para dar un total de 20 embriones por tratamiento. Los embriones fueron remojados 30 minutos en la solución antioxidante justo antes de su inoculación en el medio de inducción y antes de cada subcultivo en el medio de proliferación.

Para cada grupo de concentraciones, la siembra se realizó simultáneamente en los tres medios de cultivo. Los embriones permanecieron 30 días en los medios de inducción de brotes y fueron subcultivados cada 15 días en el medio de proliferación SH 50%. La evaluación se realizó a los 15, 35, 45 y 75 días en el medio de proliferación de brotes.

Al igual que en el ensayo 1, las semillas procedían del Paraje "El Ranchito", colectadas en 1993.

### Ensayo 3

Consistió en la optimización del medio y las condiciones de cultivo. Como **medio de inducción** se utilizó el SH adicionado de K 5 mgL<sup>-1</sup>, la solución antioxidante y sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>. En este caso se utilizaron dos lotes de semillas de la misma población (El Ranchito), una del año 1993 (R-93) y la otra de 1997 (R-97) y para cada una se exploraron dos tiempos de inducción: 30 y 60 días. El número de embriones para cada experimento fue de 80 a 140. Posteriormente, los embriones fueron transferidos al medio de proliferación de brotes.

El **medio de proliferación** fue el SH con los macronutrientes y micronutrientes al 50%, el resto de sus constituyentes al 100%, sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> y sin antioxidantes en el medio. Previo al subcultivo, los embriones se enjuagaron 30 minutos en la solución antioxidante. A la cuarta semana, las masas de brotes se dividieron en dos o tres partes con la ayuda de un bisturí y se transfirieron al medio de alargamiento.

El **medio de alargamiento** fue básicamente el mismo que el de proliferación. La variación consistió en adicionar sacarosa 20 gL<sup>-1</sup> y carbón activado 3 gL<sup>-1</sup>, la solución antioxidante sólo se empleó para remojar durante 10 a 15 minutos las masas de brotes con talla menor a los 5 mm. Los subcultivos se realizaron en el mismo medio cada tres o cuatro semanas hasta lograr la elongación de los brotes.

Aquellos brotes con longitud de 5 a 10 mm no recibieron el baño con antioxidantes, se individualizaron y fueron incubados a 22 °C.

Para todos los medios de cultivo el pH se ajustó a 5.8 con soluciones de KOH y HCl 0.5 y 1 N; se esterilizaron 18 minutos en autoclave a 121 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>. Los cultivos fueron incubados a 25 ± 2 °C, 16 horas luz y 40.5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (3000 lux).

### Análisis estadístico

Los mejores tratamientos para la formación de brotes adventicios, empleando los diferentes medios o tiempos de inducción, fueron determinados

utilizando el análisis de varianza del paquete estadístico SPSS versión 11. El nivel de significancia fue del 95% y la hipótesis nula (no existen diferencias significativas) se aceptó o se rechazó con una probabilidad  $p \geq 0.05$ , es decir, datos mayores o iguales a este valor no fueron significativos. De existir diferencias significativas se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey HSD.

Cuadro 5. Resumen de los ensayos realizados para la propagación *in vitro* de *P. chihuahuana*.

ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semillas: Paraje “El Ranchito”, Municipio de Bocoyna, Chihuahua</li> <li>• Año de colecta: 1993</li>   <li>• <b>Medio de inducción</b> B5 modificado Sacarosa 60 gL<sup>-1</sup>.</li>   <li><b>BA o K</b> (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mgL<sup>-1</sup>) <b>ANA o 2, 4-D</b> (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mgL<sup>-1</sup>)</li>   <li>Luz (16 h)/oscuridad Tiempo de inducción: 75 días</li>   <li>• <b>Medio de proliferación</b> B5 modificado 50% Sacarosa 60 gL<sup>-1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semillas: Paraje “El Ranchito”, Municipio de Bocoyna, Chihuahua</li> <li>• Año de colecta: 1993</li>   <li>• <b>Medios de inducción</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) B5 modificado</li> <li>b) MS</li> <li>c) SH</li> </ul> </li> <li>Sacarosa: a) 60 gL<sup>-1</sup> b y c) 30 gL<sup>-1</sup></li> <li>Antioxidantes en el medio y enjuague previo (30 min)</li>   <li><b>BA/ANA</b> (5/0 y 5/0.5 mgL<sup>-1</sup>) <b>K/2, 4-D</b> (5/0 y 5/0.1 mgL<sup>-1</sup>)</li>   <li>Tiempo de inducción: 30 días</li>   <li>• <b>Medio de proliferación</b> SH 50% Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> Antioxidantes en el medio Enjuague de embriones en la solución antioxidante previo a los subcultivos (30 min)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semillas: Paraje “El Ranchito”, Municipio de Bocoyna, Chihuahua</li> <li>• Año de colecta: 1993 y 1997</li>   <li>• <b>Medio de inducción</b> SH + K (5 mgL<sup>-1</sup>) Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> Antioxidantes en el medio</li>   <li>Tiempo de inducción: 30 y 60 días</li>   <li>• <b>Medio de proliferación</b> SH (macros y micros al 50%) Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup> Sin antioxidantes en el medio Enjuague previo con antioxidantes (30 min)</li>   <li>• <b>Medio de alargamiento</b> SH (macros y micros al 50%) Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup> Carbón activado 3 gL<sup>-1</sup> Sin antioxidantes en el medio Enjuague previo con antioxidantes (10 a 15 min)</li> </ul>

## 2. Análisis estructural

Las técnicas histológicas se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Judith Márquez.

Para el análisis estructural, por cada tratamiento del segundo ensayo, se fijaron dos embriones a los 15 y 30 días de permanecer en los medios de inducción y, dos embriones a los 15 días en el medio de proliferación de brotes. Los tejidos fueron procesados para ser incluidos en Paraplast.

Los embriones fijados en FAA (formaldehído:ácido acético:etanol:agua 10:5:50:35) fueron lavados una hora en agua corriente, después se deshidrataron durante 15 minutos en cada uno de los etanoles graduales al 30, 50, 70, 80 y 96%, y dos cambios en etanol absoluto; posteriormente permanecieron cinco minutos en xilol antes de someterlos a tres procesos de impregnación con mezclas de xilol-paraplast (1:1), xilol-paraplast (1:2) y otro de paraplast puro, todos a 56 °C y durante 24 horas cada uno. Finalmente, los embriones se incluyeron en paraplast puro, orientándolos longitudinalmente. Esta metodología se resume en diagrama de flujo de la Figura 10.

Los cortes de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de grosor se realizaron con un microtomo de rotación (AO 820). Los tejidos fueron teñidos con safranina-verde rápido (S-VR) para la detección de núcleos y paredes celulares (Johansen, 1940), con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y azul negro naftol como prueba histoquímica para detectar polisacáridos insolubles y proteínas, y prueba de vainillina para la detección de taninos (Jensen, 1962; López *et al.*, 1998).

Se seleccionaron las mejores preparaciones y se montaron con Bálsamo de Canadá para posteriormente ser analizadas y realizar tomas en un fotomicroscopio.

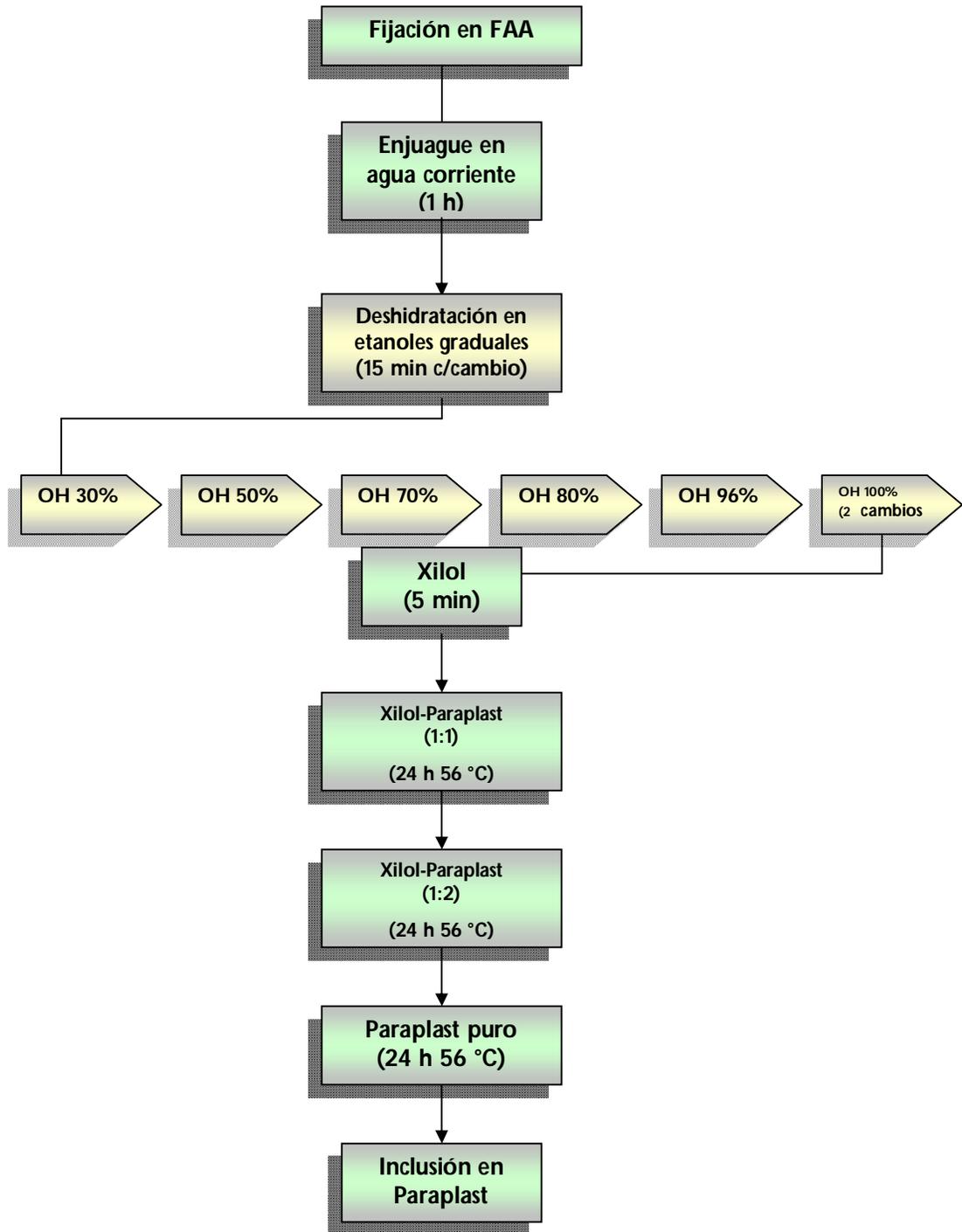


Fig. 10. Técnica para la deshidratación e inclusión en Paraplast de embriones de *P. chihuahuana* para su análisis histológico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Cultivo de tejidos

#### Respuestas morfogénicas

A los 15 días, los cotiledones fueron las estructuras en manifestar las primeras respuestas morfogénicas. Los primeros cambios que se presentaron en la fase de inducción variaron dependiendo del medio de cultivo utilizado.

Fue en el medio B5 modificado donde se presentó la mayor variedad de respuestas: en embriones completos el cambio mínimo consistió en la proliferación de callo verde a partir de uno o dos cotiledones; otra respuesta fue que todos los cotiledones del embrión, verdes y turgentes, se separaran en un ángulo de 180°, o bien, que los cotiledones se elongaran y se curvaran hacia atrás de manera convexa con respecto a la superficie del medio, en tanto que el hipocótilo, en todos los casos, no sufriera cambio alguno en forma y color. Fue común el ensanchamiento del embrión, donde el hipocótilo adquirió una coloración rojiza y una curvatura cóncava con respecto a la superficie del medio de cultivo y, los cotiledones que no estaban en contacto con él se alargaron; esto concuerda con lo descrito por Ellis y Bilderback (1989) para *Pinus ponderosa*. También se observó la desorganización del cuerpo del embrión para formar callo.

En los medios MS y SH, en general, los cambios morfológicos fueron similares, y consistieron en el ensanchamiento del embrión, principalmente en la región de los cotiledones, la cual adquirió una coloración verde y, la característica tonalidad rojiza del hipocótilo. El cuerpo del embrión también presentó la curvatura cóncava en contacto con la superficie del medio, además del crecimiento organizado de los tejidos, a excepción del medio MS, donde se presentaron varios casos donde éstos se desorganizaron formando callo.

En ausencia de reguladores del crecimiento (testigo) los embriones no respondieron, tampoco germinaron y finalmente se oxidaron. Las diferentes respuestas obtenidas se resumen visualmente en la Figura 11.

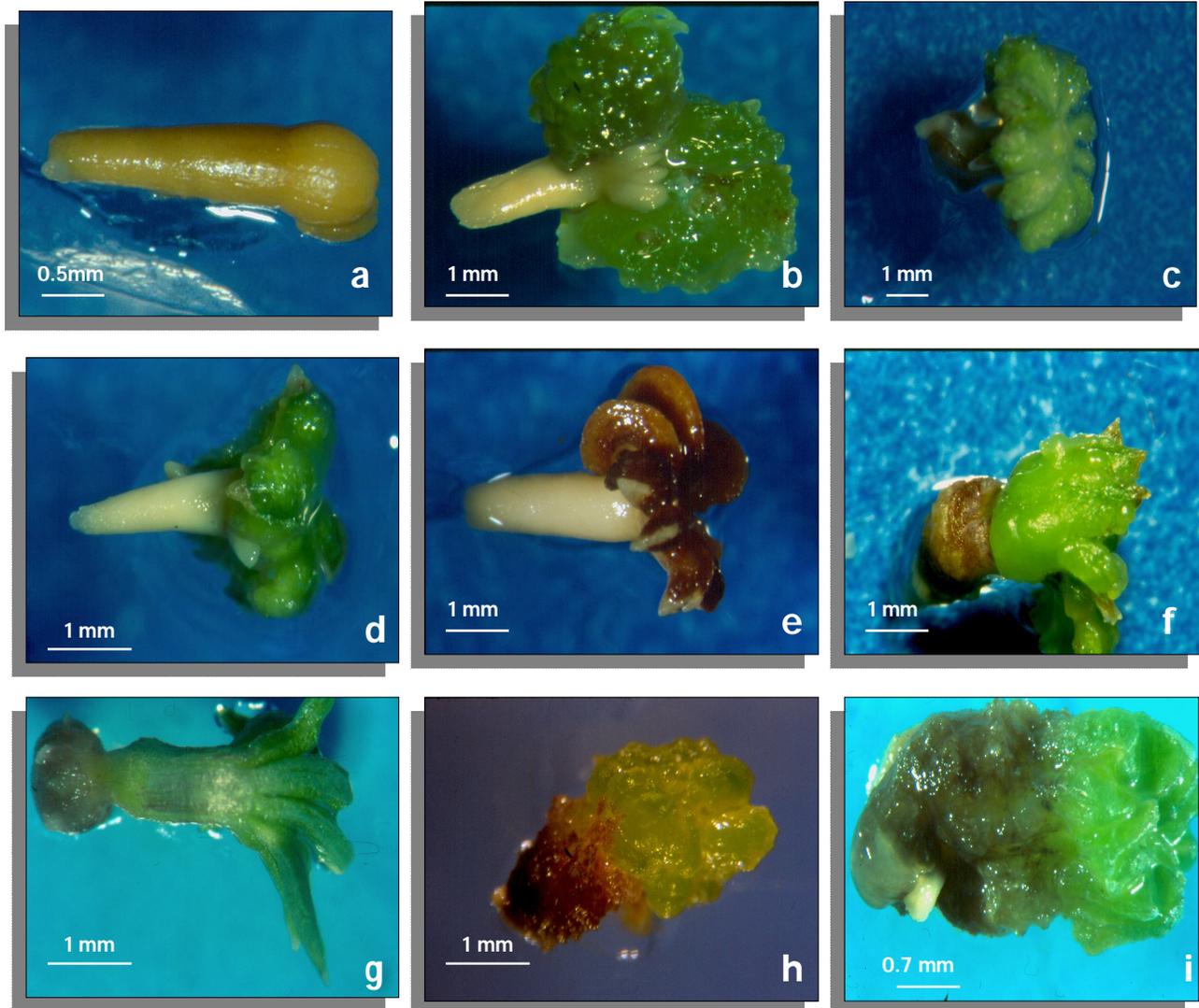


Fig. 11. Respuestas morfogénicas más comunes que presentaron los embriones maduros de *P. chihuahuana* durante las primeras etapas del cultivo *in vitro*: **a)** oxidación de los embriones en el medio sin reguladores del crecimiento; **b)** callo verde formado solo en los cotiledones que están en contacto con el medio; **c, d y e)** apertura de los cotiledones en un ángulo de 180 ° y su eventual curvatura hacia atrás; **f)** ensanchamiento del embrión adquiriendo una curvatura cóncava con respecto a la superficie del medio; **g)** embriones verdes con los cotiledones superiores curvados hacia el medio de cultivo, **h, i)** desorganización de los tejidos del embrión para formar callo.

La falta de respuesta en los explantes en ausencia de reguladores del crecimiento fue reportada también en *Pinus taeda*, donde ocurrió algo similar en los cotiledones inmaduros cultivados *in vitro*, donde los explantes cultivados en ausencia de la citocinina BA murieron en corto tiempo (García-Ferriz *et al.*, 1994).

No obstante que la germinación *in vitro* de los embriones maduros en coníferas es una práctica usual para la obtención de los cotiledones jóvenes para ser utilizados como explantes, en *P. chihuahuana* la conversión de embriones germinados en plántulas nunca fue observada, al igual como lo reportó López (2000), por lo que es posible que esta especie requiera el estímulo del regulador de crecimiento, o bien, que la presencia de sus tejidos de reserva (megagametofito) fuera vital para este proceso. Carrier *et al.* (1997) mencionaron que, durante la germinación normal de los embriones maduros de *Picea glauca*, los lípidos contenidos en el megagametofito fueron metabolizados a malato conduciendo a la síntesis de sacarosa, la cual estuvo disponible para el desarrollo del embrión hasta que la fotoautotofía fue alcanzada, por lo que el esqueleto de carbono proporcionado por el megagametofito resultó esencial para el desarrollo de las plántulas.

La formación de los brotes adventicios fue por organogénesis directa y únicamente en aquellos tratamientos con reguladores del crecimiento; los brotes principalmente proliferaron en la superficie de los cotiledones y escasamente sobre el hipocótilo. Al término del periodo de inducción los cotiledones mostraron diminutas protuberancias que dieron al tejido apariencia nodular y que posteriormente proliferaron en el medio sin reguladores del crecimiento. Alrededor de estos ápices meristemáticos se desarrollaron primordios foliares que después se elongaron para formar los brotes adventicios.

Los eventos relacionados con la formación y desarrollo de los brotes adventicios se discuten con más detalle en el análisis histológico.

## Organogénesis

### ○ Ensayo 1 (Medio B5 modificado)

Después de ensayar las 49 combinaciones con las dos series de reguladores de crecimiento, y las dos condiciones de cultivo, luz (fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad) y oscuridad constante, se encontró que la formación de brotes ocurrió sólo vía organogénesis.

#### a) Tratamientos con K/2,4-D

Altas concentraciones de kinetina ( $1-5 \text{ mgL}^{-1}$ ) promovieron la formación de un mayor número de brotes adventicios. La formación de éstos estuvo asociada a la presencia de auxina, principalmente en bajas concentraciones; 2,4-D  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  fue la concentración presente en los tratamientos inductores, en luz y en oscuridad.

La mejor respuesta ocurrió en luz con  $5/0.1 \text{ mgL}^{-1}$  K/2, 4-D, donde después de tres meses en el medio de proliferación de brotes (B5 modificado al 50% sin reguladores del crecimiento) se obtuvieron 18 brotes por tratamiento (Tabla I); en las mismas concentraciones pero en condiciones de oscuridad sólo se formaron 6 brotes (Tabla II). Un escaso número de tratamientos en oscuridad (cinco de 49) respondieron a la formación de brotes. En cambio, en condiciones de luz respondieron 15 de 49. La respuesta de los embriones en este tratamiento fue notoriamente escasa, no obstante que permanecieron en cultivo el suficiente tiempo para ello (75 días en el medio de inducción + tres meses en el medio de proliferación).

Las tablas I y II sólo muestran los tratamientos dónde ocurrió la organogénesis, en el resto de los tratamientos los tejidos se desorganizaron y finalmente se oxidaron.

Tabla I. Número de brotes adventicios por tratamiento **kinetina/2,4-D** en **luz** (16 h), a partir de embriones maduros de *P. chihuahuana*. Resultados a los tres meses en medio de proliferación de brotes B5 modificado 50% sin reguladores del crecimiento.

K/2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	No. de brotes/ tratamiento	Promedio de brotes/embrión $\bar{X} \pm E.S.$
0.5/0.5	1	0.2 $\pm$ 0.20
0.5/1	1	0.2 $\pm$ 0.20
0.5/3	1	0.2 $\pm$ 0.20
1/0.1	6	1.2 $\pm$ 0.97
1/0.5	1	0.2 $\pm$ 0.20
1/4	4	0.8 $\pm$ 0.58
2/0	1	0.2 $\pm$ 0.20
2/2	4	0.8 $\pm$ 0.58
2/3	8	1.6 $\pm$ 1.60
2/4	7	1.4 $\pm$ 0.87
3/1	1	0.2 $\pm$ 0.20
4/1	4	0.8 $\pm$ 0.80
<b>5/0.1</b>	<b>18</b>	<b>3.6 <math>\pm</math> 3.60</b>
5/1	4	0.8 $\pm$ 0.802
5/2	6	1.2 $\pm$ 1.203

n=5

Tabla II. Número de brotes adventicios por tratamiento **kinetina/2,4-D** en **oscuridad**, a partir de embriones maduros de *P. chihuahuana*. Resultados a los tres meses en medio de proliferación de brotes B5 modificado 50% sin reguladores del crecimiento

K/2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	No. de brotes/ tratamiento	Promedio de brotes/embrión $\bar{X} \pm E.S.$
1/0.1	2	0.4 $\pm$ 0.40
1/2	1	0.2 $\pm$ 0.20
4/0.1	2	0.4 $\pm$ 0.40
<b>5/0.1</b>	<b>6</b>	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.80</b>
5/2	3	0.6 $\pm$ 0.60

n=5





tóxicos e inhiben el crecimiento de los tejidos cultivados provocando su muerte por necrosis. George y Sherrington (1984) mencionan que la exposición a la luz de los tejidos cultivados incrementa la actividad de las enzimas que promueven la biosíntesis y la oxidación de los fenoles, por lo que para prevenirla o reducirla se recomienda mantenerlos en oscuridad un tiempo antes de exponerlos a una baja intensidad luminosa.

En prácticamente todos los experimentos del ensayo 1, la oxidación fue un evento frecuente en los tejidos cultivados de *P. chihuahuana*, inclusive en los mantenidos en oscuridad, al igual que lo reportado para *Pinus pinaster* donde los explantes en oscuridad se tornaron cafés y necróticos (Rancillac, 1991).

Para evitar o reducir la oxidación, en los siguientes ensayos se procedió a añadir antioxidantes o carbón activado a los medios de cultivo así como un remojo a los explantes en una solución de antioxidantes (ácido cítrico+ácido ascórbico) previo a la siembra y antes de cada subcultivo, controlando de esta forma notoriamente el problema y permitiendo el crecimiento y desarrollo de los brotes previamente formados.

La luz fue un factor importante para la morfogénesis en condiciones controladas ya que favoreció la diferenciación de brotes. En ambas series de reguladores del crecimiento, K/2,4-D y BA/ANA, tanto en luz como en oscuridad, ocurrió la formación de brotes, siendo mayor en condiciones de iluminación. Ellis y Bilderback (1991) obtuvieron una respuesta similar en *Pinus ponderosa*, cuyos embriones cultivados en oscuridad total durante el período de inducción dieron como resultado la formación de brotes, sin embargo, el número promedio de brotes por embrión fue reducido a la mitad comparado con aquellos formados en luz. Lo contrario fue reportado en embriones de *Pinus caribaea*, donde la mayor frecuencia de regeneración de brotes fue obtenida con una baja intensidad luminosa constante (Berlyn *et al.*, 1991); en cambio, en embriones de *Picea abies*, ni la temperatura ni la luz fueron factores críticos para las primeras etapas de formación de brotes adventicios, sin embargo para las etapas posteriores de su desarrollo sí lo fueron (von Arnold y Ericsson, 1985).

En otros tejidos cultivados *in vitro*, como los cotiledones de *Pinus radiata*, no se logró diferenciar tejido meristemático al ser incubados en oscuridad continua (Villalobos *et al.*, 1984, citado por Robledo, 1987), mientras que en hojas aisladas de *Picea abies* fue necesario un fotoperíodo de al menos seis horas para el proceso de inducción de brotes (von Arnold y Ericsson, 1979).

Tanto en K/2,4-D y BA/ANA se presentaron numerosas alteraciones morfológicas de los brotes y/o problemas de hiperhidratación, no obstante, se detectaron un mayor número de anormalidades en presencia de BA/ANA. Muchas de las anormalidades en los cultivos *in vitro* se atribuyen al agar, debido a que en los medios de cultivo químicamente definidos éste es la mayor fuente de variación desconocida. Se ha comprobado que las diferentes marcas de agar pueden presentar diferencias en su rendimiento, atribuidas a la difusión limitada de los componentes del medio y agua, impurezas y diferencias en el pH y en su firmeza provocadas por la esterilización a 120 °C. Scholten y Pierik (1998) realizaron el análisis físico y químico de varios tipos de agares, encontrando que la calidad en el rendimiento del DifcoBacto Agar® era pobre en comparación del agar Merck 1614®, este último considerado de rendimiento moderado.

Por lo anterior, en los ensayos 2 y 3 se utilizó agar-agar (Merck®), que de acuerdo a sus características se considera un agar más purificado (Bonga y von Aderkas, 1992).

#### o **Ensayo 2 (Medios B5 modificado, MS y SH)**

Con base en los resultados del ensayo 1 se determinó que los mejores tratamientos fueron K/2,4-D 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> (18 b) y BA/ANA 5/0.5 mgL<sup>-1</sup> (24 b), ambos en condiciones de luz (fotoperíodo 16 horas). Debido a la baja respuesta de formación de brotes, a la continua necrosis de los tejidos, y con la finalidad de explorar su comportamiento en otros medios nutritivos, estas combinaciones se repitieron utilizando como medio de inducción, además del medio B5 modificado, los medios MS y SH. Para las dos citocininas utilizadas (K y BA) también se empleó la concentración 5 mgL<sup>-1</sup> en ausencia de auxinas. De esta

forma, las combinaciones ensayadas fueron, además del testigo, para K/2,4-D: 5/0 y 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> y para BA/ANA: 5/0 y 5/0.5 mgL<sup>-1</sup>.

**a) Medio de inducción (30 días)**

A los 30 días de inducción los embriones mostraron un crecimiento diferencial en biomasa de acuerdo al medio de cultivo y que de mayor a menor fue: B5 modificado > MS > SH. Esta condición se dio en todos los tratamientos ensayados con reguladores del crecimiento.

En los tratamientos con BA/ANA el mayor porcentaje de embriones que manifestaron alguna de las respuestas anteriores ocurrió en medio SH 5/0.5 (85%), seguido del B5 modificado 5/0.5 (75%), y finalmente el medio MS donde los porcentajes fueron notoriamente bajos (30-35%). En los tratamientos con K/2,4-D, las diferencias no fueron tan evidentes como lo fueron con BA/ANA, sin embargo en todos los casos estuvo por arriba del 50% (Tabla V).

Tabla V. Porcentaje de embriones con respuesta al término del periodo de inducción (30 días) en tres medios de cultivo.

Medio	K/2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	Embriones con respuesta	%	BA/ANA (mgL <sup>-1</sup> )	Embriones con respuesta	%
<b>B5 modificado</b>	5/0	15/20	75	5/0	10/20	50
<b>MS</b>	5/0	12/20	60	5/0	7/20	35
<b>SH</b>	5/0	13/20	65	5/0	8/20	40

<b>B5 modificado</b>	5/0.1	12/20	60	<b>5/0.5</b>	<b>15/20</b>	<b>75</b>
<b>MS</b>	5/0.1	14/20	70	5/0.5	6/20	30
<b>SH</b>	5/0.1	11/20	55	<b>5/0.5</b>	<b>17/20</b>	<b>85</b>

Es probable que los primeros cambios que sufrieron los embriones no estuvieran determinados por la concentración de los reguladores del crecimiento, sino más bien que estuvieran asociados al tipo de medio de cultivo.

Fue característico el desarrollo morfológico que siguieron los embriones en cada uno de los diferentes medios de inducción (Figura 12):

- En el medio B5 modificado los explantes presentaron una tendencia hacia la desorganización de los tejidos. El callo verde formado se hizo desmenuzable en posteriores subcultivos; otros embriones no formaron callo pero se mostraron muy turgentes.
- En el medio SH el cuerpo de embrión se hinchó, adquirió una curvatura y los cotiledones se pusieron turgentes y verdes. En ocasiones se oxidó el extremo distal del hipocótilo.
- En MS, los embriones mostraron características de crecimiento intermedias entre los medios SH y B5 modificado.



Fig. 12. Aspecto de los embriones después de permanecer 30 días en los tres diferentes medios de inducción (Barra= 1 mm).

Las respuestas morfogénicas ocurrieron por organogénesis directa y sólo en aquellos tratamientos con reguladores de crecimiento. Al término del período de inducción, los embriones mostraron diminutas protuberancias semiesféricas que se manifestaron principalmente sobre los cotiledones y, en algunos casos, en el hipocótilo.

Estas estructuras fueron las primeras en aparecer en los tejidos, sin embargo, es probable que cada protuberancia no necesariamente correspondiera a un brote en formación, ya que a partir de éstas también se llegaron a desarrollar estructuras semejantes a hojas denominadas "filoides" por Bonga y von Aderkas (1992).

No obstante que los medios contenían antioxidantes y que a los explantes se les dio un baño con la misma solución, los tejidos comenzaron a necrosarse, principalmente en los medios sin reguladores del crecimiento. Aquellos embriones que no respondieron en este período ya no lo hicieron posteriormente.

#### ***b) Medio de proliferación***

Quince días después de la primera transferencia al medio de proliferación de brotes (SH 50%), la mayoría de los explantes que habían sido cultivados en los tratamientos sin reguladores del crecimiento estaban oxidados; de los dos lotes controles ensayados, en uno se oxidó el 100 % y en el otro el 83 %. La oxidación también se presentó en algunos tratamientos con reguladores, esto ocurrió principalmente en medio B5 modificado, donde comenzaron a oxidarse del 60 al 95% de los tejidos.

En esta fase, todos los tratamientos procedentes de los tres medios de inducción (B5 modificado, MS y SH) adicionados de BA/ANA y K/2,4-D, manifestaron por lo menos una de las siguientes respuestas morfogénicas: protuberancias semiesféricas, estructuras parecidas a hojas, primordios de brotes y brotes (Figura 13).

Después de 30 días en el medio de proliferación se incrementó el número de brotes adventicios. El mejor tratamiento fue en medio SH adicionado con BA  $5\text{mgL}^{-1}$ , donde respondieron más embriones a la formación de brotes (5/10) y se desarrolló el mayor número de regenerantes (45). La cantidad de brotes por explantes fue variable: el mínimo fue uno y el máximo 28 (Tabla VI).

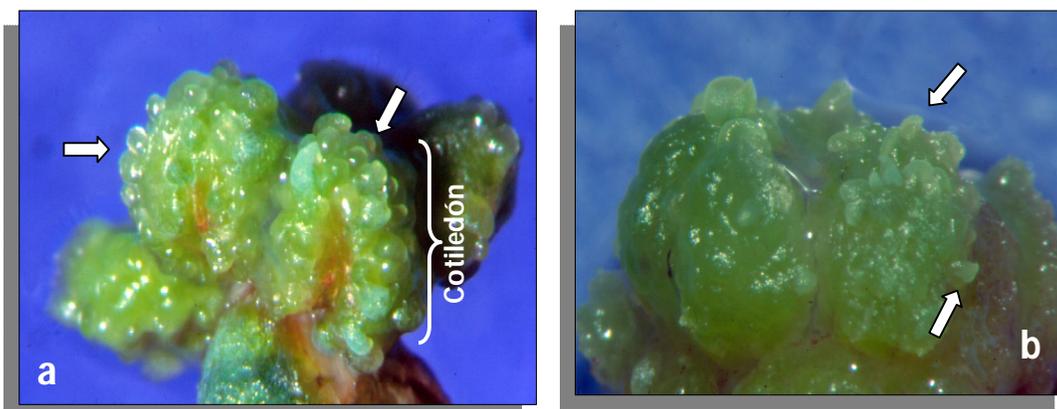


Fig. 13. Respuestas morfogénicas presentes en los explantes cultivados con BA/ANA y K/2,4-D en los tres medios de cultivo. **a)** Protuberancias semiesféricas ( $\Rightarrow$ ) sobre los cotiledones cultivados *in vitro* de *P. chihuahuana*; **b)** estructuras parecidas a hojas o “filoides” ( $\Rightarrow$ ) desarrolladas de forma aislada sobre el explante.

Tabla VI. Desarrollo de brotes adventicios procedentes de tres medios de inducción con BA/ANA. Resultados a los 30 días en medio de proliferación (SH 50%). n=20.

Medio*Inductor	BA/ANA (mgL <sup>-1</sup> )	Embriones con brotes	%	Total de brotes/tratamiento
<b>B5 modificado</b>	5/0	1/20	5	1
<b>MS</b>	5/0	1/20	5	3
<b>SH</b>	<b>5/0</b>	<b>5/20</b>	<b>25</b>	<b>45</b>

<b>B5 modificado</b>	5/0.5	2/20	10	4
<b>MS</b>	5/0.5	0/20	0	0
<b>SH</b>	5/0.5	1/20	5	1

\* 30 días

En los tratamientos con K/2,4-D se desarrollaron más brotes (18) en medio MS adicionado sólo con Kinetina (5 mgL<sup>-1</sup>); el segundo mejor resultado fue el obtenido en medio B5 modificado con 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> donde se formaron 16 brotes (Tabla VII).

Tabla VII. Desarrollo de brotes adventicios procedentes de tres medios de inducción con K/2,4-D. Resultados a los 30 días en medio de proliferación (SH 50%). n=20.

Medio* Inductor	K/2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	Embriones con brotes	%	Total de brotes/tratamiento
<b>B5 modificado</b>	5/0	3/20	15	9
<b>MS</b>	<b>5/0</b>	<b>2/20</b>	<b>10</b>	<b>18</b>
<b>SH</b>	5/0	3/20	15	4

<b>B5 modificado</b>	<b>5/0.1</b>	<b>4/20</b>	<b>20</b>	<b>16</b>
<b>MS</b>	5/0.1	2/20	10	8
<b>SH</b>	5/0.1	2/20	10	3

\*30 días

En los tratamientos con estos reguladores del crecimiento fue notoria la presencia de diminutos nódulos verdes en forma de agregados en cuya superficie se distinguían ligeras depresiones longitudinales que parecían hojas fusionadas (datos no mostrados).

Aquellos embriones que no formaron brotes en el medio de proliferación, si pudieron presentar las protuberancias sobre los cotiledones y/o los "filoides".

A excepción del medio SH, los explantes cultivados en B5 modificado y MS, mostraron porciones de tejido necrosado por efecto de la oxidación.

Las tablas VIII y IX muestran la cantidad de brotes adventicios que se formaron en los embriones a los 15, 30, 45 y 75 días en medio SH 50% adicionado con BA/ANA y K/2,4-D respectivamente.

Después de 75 días, un número significativo de brotes se desarrollaron en el medio SH adicionado con BA/ANA 5/0 y 5/0.5 mgL<sup>-1</sup>: 118 y 107 brotes respectivamente. En las mismas dos concentraciones, pero con medio B5 modificado, de manera contrastante sólo se observaron 8 y 35 brotes respectivamente; en cambio, en MS, los explantes finalmente murieron por la oxidación.

Tabla VIII. Desarrollo de brotes adventicios procedentes de tres medios de inducción con BA/ANA. Resultados a los 15, 30, 45 y 75 días del subcultivo en medio de proliferación (SH 50%). n=20.

Medio* Inductor	BA/ANA (mgL <sup>-1</sup> )	TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO EN SH 50% (días)			
		15	30	45	75
SH	5/0	1	45	61	118
B5 modificado	5/0	0	1	2	8
MS	5/0	0	3	3	----
SH	5/0.5	0	1	2	107
B5 modificado	5/0.5	0	4	14	35
MS	5/0.5	0	0	0	----

\*30 días

Para los tratamientos con K/2,4-D la mayor regeneración de brotes nuevamente se manifestó en medio SH con ambas combinaciones de reguladores, 5/0 y 5/0.1, aunque el mayor número de ellos (133) fue en esta última. La respuesta en los medios B5 modificado y MS fue heterogénea y las diferencias no fueron tan marcadas como con BA/ANA; sin embargo, el número de brotes fue siempre mayor en el medio SH. Al observar ambas tablas, es notorio que en los explantes con K/2,4-D se formaron inicialmente más brotes que en los medios con BA/ANA (ver columna a los 15 días); además, fue con este juego de reguladores donde se encontró la respuesta óptima.

Tabla IX. Desarrollo de brotes adventicios procedentes de tres medios de inducción con K/2,4-D. Resultados a los 15, 30, 45 y 75 días del subcultivo en medio de proliferación (SH 50%). n=20.

Medio* Inductor	K/2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO EN SH 50% (días)			
		15	30	45	75
SH	5/0	4	4	7	107
B5 modificado	5/0	1	9	12	20
MS	5/0	5	18	29	34
SH	5/0.1	2	3	5	133
B5 modificado	5/0.1	6	16	17	39
MS	5/0.1	0	8	10	50

\*30 días

El análisis de varianza demostró que existieron diferencias significativas para el número de brotes obtenidos después de 75 días en el medio de proliferación, considerando las condiciones ensayadas que fueron los tres diferentes medios de inducción adicionados con las dos series de reguladores del crecimiento (Tabla X).

Tabla X. Análisis de varianza para el número de brotes obtenidos en embriones maduros de *P. chihuahuana* procedentes de tres medios de inducción (B5 modificado, MS y SH) adicionado con BA/ANA y K/2,4-D. Resultados a los 75 días del subcultivo en medio de proliferación (SH 50%).

	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Significancia P>F
Tratamientos	11	1303.013	118.456	3.878	.000

La prueba de Tukey aplicada para las mismas condiciones (Tabla XI) corroboró que el tratamiento SH+K/2,4-D 5/0.1 fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. Además se puede observar una clara diferencia estadística del efecto que tuvo el medio de inducción utilizado, siendo el SH el mejor medio para promover la formación de brotes adventicios, con respecto a los medios B5 modificado y MS.

Tabla XI. Prueba de Tukey para el número de brotes obtenidos en embriones maduros de *P. chihuahuana* procedentes de tres medios de inducción (B5 modificado, MS y SH) adicionado con BA/ANA y K/2,4-D. Resultados a los 75 días del subcultivo en medio de proliferación (SH 50%).

Medio	RC	Concentración mgL <sup>-1</sup>	Grupos homogéneos
MS	BA/ANA	5/0	a
MS	BA/ANA	5/0.5	a
B5 mod	BA/ANA	5/0	a b
B5 mod	K/2,4-D	5/0	a b c
MS	K/2,4-D	5/0	a b c
B5 mod	BA/ANA	5/0.5	a b c
B5 mod	K/2,4-D	5/0.1	a b c
MS	K/2,4-D	5/0.1	a b c
SH	K/2,4-D	5/0	a b c
SH	BA/ANA	5/0.5	a b c
SH	BA/ANA	5/0	b c
<b>SH</b>	<b>K/2,4-D</b>	<b>5/0.1</b>	<b>c</b>

n=20      RC= Regulador del Crecimiento

La mayoría de los brotes obtenidos fueron diminutos (1 mm) y proliferaron entre los 45 y 75 días, cuando el tejido se disgregó al ser manipulado durante los subcultivos quincenales.

Se observó que estos brotes provenían de los agregados nodulares, que a simple vista se observaban con hojas aparentemente fusionadas, las cuales, después de este período de maduración, comenzaron a diferenciarse (Figura 14a).

Los regenerantes que procedían de los nódulos se observaron con cierta turgencia y muy húmedos, características semejantes a las que se presentan en el fenómeno de hiperhidratación, sin embargo es probable que esta apariencia vítrea se debiera a la solución antioxidante que permanecía en su superficie después de los enjuagues. Después de elongarse e individualizarse, adquirieron un aspecto normal, pero su desarrollo fue muy lento y no sobrepasaron los 5 mm de longitud (Figura 14b).

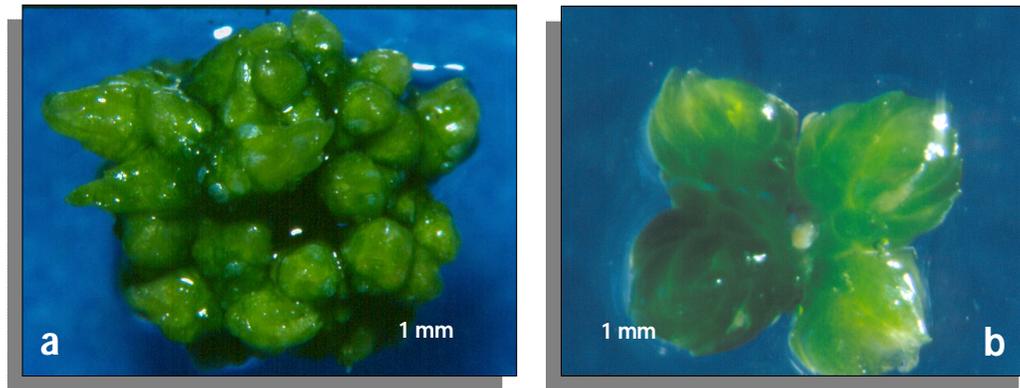


Fig. 14. **a)** Agregados de brotes ( $\leq 1$  mm) de aspecto nodular con las hojas aparentemente fusionadas; **b)** los brotes se disgregaron fácilmente al manipularlos durante los subcultivos y al individualizarlos su desarrollo fue muy lento.

En aquellos explantes donde los brotes permanecieron juntos, la máxima elongación fue de 5 mm, muy probablemente esto se debió a que existiera una competencia entre ellos por los nutrientes del medio, ya que en cultivo de tejidos frecuentemente se observa que uno de los brotes es el que predomina sobre los demás y alcanza la mayor talla (Figura 15).



Fig. 15. Los brotes se desarrollaron de manera asincrónica donde generalmente uno de ellos ( $\Rightarrow$ ) predominó sobre los demás.

Una manera de promover su elongación y evitar la competencia fue separarlos mecánicamente, aunque esto no siempre fue posible debido a su tamaño diminuto. Es recomendable que los regenerantes

alcancen un tamaño mayor o igual a 5 mm para individualizarlos exitosamente sin dañarlos.

Uno de los factores limitantes para el desarrollo de los brotes fue la necrosis por oxidación que se presentó desde las primeras etapas en los cultivos. Ésta fue más evidente en los medios sin reguladores del crecimiento, aunque también se presentó en gran parte de los explantes procedentes de los tratamientos en los medios B5 modificado y MS, principalmente después del tercer subcultivo al medio de proliferación.

La oxidación fue controlada parcialmente al proporcionar enjuagues con la solución antioxidante y utilizar desde un principio como medio inductor el SH; aquellos embriones que estuvieron en esta condición permanecieron verdes después de más de 100 días de cultivo. Kurz, 1986 (citado por Preece y Compton, 1991) señaló que en yemas de árboles adultos de *Picea glauca* el uso del medio SH dio resultados positivos en el control de la oxidación, a diferencia de los medios MS, WPM y B5.

En el ensayo 2 los mejores resultados fueron obtenidos utilizando como medio de inducción SH adicionado con K/2,4-D 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> (133 brotes/tratamiento) y SH adicionado con BA 5 mgL<sup>-1</sup> (118 brotes/tratamiento), a los 75 días en el medio SH 50% (medio de proliferación). Los brotes obtenidos mostraron un crecimiento vigoroso y escasa oxidación. No obstante en los medios B5 modificado y MS los brotes también proliferaron, la mayoría de ellos terminaron oxidados, lo que impidió que continuaran su desarrollo (Figura 16).

El tiempo de inducción (30 días) fue suficiente para promover la formación de los primordios de brotes. Su desarrollo como brotes ocurrió generalmente a los 15 días en el medio SH 50% y la máxima proliferación entre los 45 y 75 días.



Fig. 16. La oxidación de los tejidos y los brotes en diferentes etapas fue un factor limitante para su crecimiento y posterior desarrollo en los medios B5 modificado y MS. El uso de medio SH y la aplicación de una solución antioxidante en el medio de cultivo y enjuagues previos a los subcultivos redujeron notablemente el problema.

o **Ensayo 3 (SH+K 5 mgL<sup>-1</sup>)**

Con base en los mejores resultados del ensayo 2, se realizó el tercer ensayo con el fin de optimizar el número y calidad de los brotes obtenidos, además de explorar la respuesta de los embriones proporcionando dos tiempos de inducción (30 y 60 días) en semillas procedentes de una misma población ("El Ranchito"). Las semillas se cosecharon en dos años diferentes (1993 y 1997) por lo que, tomando en cuenta que el ensayo se realizó en agosto de 1999, las semillas del primer lote tenían 6 años de almacenamiento y el segundo dos.

Las respuestas morfogénicas de ambos lotes fueron similares a las descritas anteriormente al inicio de los resultados y discusión: básicamente la formación de los brotes siempre ocurrió por organogénesis directa y a partir de

los cotiledones, por lo que no hubo diferencias en cuanto a la edad de las semillas colectadas. Una vez que los cotiledones se ponían verdes y turgentes, sobre su superficie comenzaron a formarse las diminutas protuberancias en forma de domo. Dichos domos eventualmente se desarrollaron en "filoides", o bien, las protuberancias pudieron ser domos meristemáticos en cuyo alrededor se formaron primordios foliares (Figura 17a) que posteriormente se transformaron en brotes. A los ápices meristemáticos que presentaron primordios foliares a su alrededor y que midieron menos de 1 mm de longitud se les denominó "primordios de brotes" (Figura 17a-c); cuando dichas estructuras alcanzaron un tamaño mayor o igual a 1 mm y las hojas se elongaron cubriendo al ápice se les llamó "brotes" (Figura 17d-f).

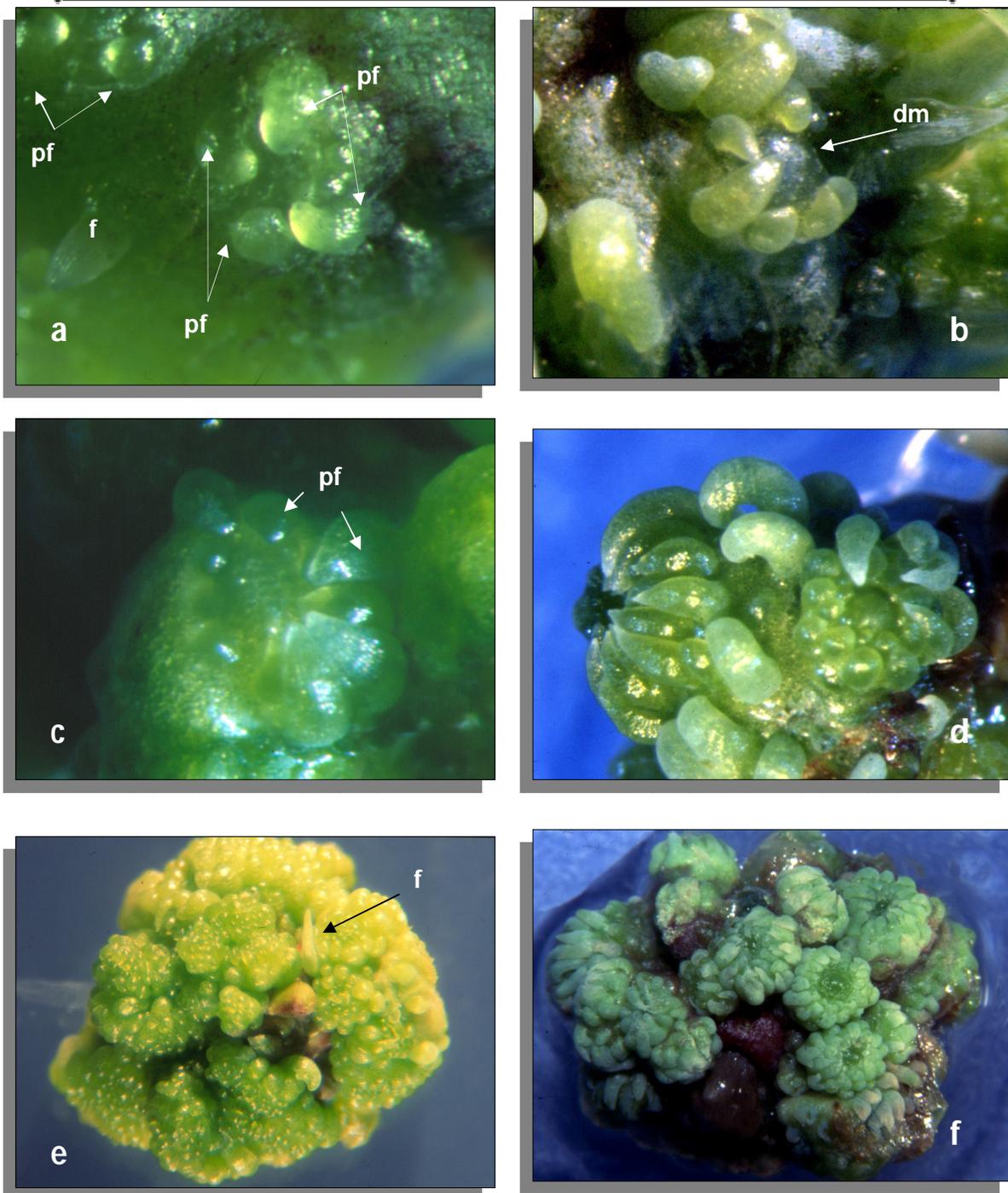


Fig. 17. Secuencia del desarrollo *in vitro* de los primordios de brotes (a-c) y de los brotes adventicios (d-f) de *P. chihuahuana* : **a**) domos meristemáticas rodeados del primer par y de los siguientes cuatro primordios foliares (pf), a la izquierda se observa un "filoide" (f); **b y c**) los primordios foliares (pf) se van alargando y surgiendo nuevos para cubrir al domo meristemático (dm) hasta cubrirlo completamente; **d**) el desarrollo de las hojas continúa mientras el brote se elonga; **e y f**) aspecto de los embriones maduros cubiertos de brotes en diferentes etapas de desarrollo y donde se observa también el crecimiento de "filoides" (f).

**a) SH+K 5 mgL<sup>-1</sup> (30 días de inducción)**

- *Semillas de "El Ranchito" colectadas en 1993*

La respuesta de los explantes de este lote de embriones fue escasa (13.5%) después de 30 días de permanecer en el medio de inducción. La mayoría de los embriones no tuvo ninguna respuesta o bien, presentaron signos de oxidación y finalmente se necrosaron. Veinte días después de su transferencia al medio de proliferación (50 días de cultivo) los embriones que sobrevivieron (19/140) ya presentaron algunos primordios de brotes y diminutos brotes diferenciados. Después de 90 días de cultivo el promedio de brotes por embrión fue de 6.3, y éstos midieron de 1 a 5 mm de longitud. Posteriormente los cúmulos de brotes fueron transferidos al medio de alargamiento y después de 140 días de cultivo muchos de los brotes no prosperaron reduciéndose a un promedio de 3 brotes por embrión.

- *Semillas de "El Ranchito" colectadas en 1997*

El 100% de los embriones de este lote tuvieron alguna respuesta morfogénica, sin embargo sólo el 65% de los embriones (52/80) fueron regenerativos y formaron brotes. Treinta días después de su transferencia en el medio de proliferación, y previo al subcultivo al medio de alargamiento, el 51% del total de los embriones sembrados presentaron algún signo de oxidación. Las estructuras formadas estuvieron presentes en los cotiledones de manera simultánea, pero su desarrollo fue asincrónico. Hasta esta etapa fue posible contar el número de brotes por embrión ya que, debido a la manipulación de los mismos durante su remojo en la solución antioxidante, los cúmulos de brotes se disgregaron impidiendo llevar un conteo adecuado posterior.

A los 60 días de cultivo (30 días de inducción + 30 en medio de proliferación) el 56% de los embriones (45/80) presentaron primordios de brotes (< 1 mm). El promedio de primordios de brotes por embrión fue 6.1. El porcentaje de embriones que presentaron brotes  $\geq$  1mm fue mucho menor en esta fase (2.5%), obteniéndose un promedio de 1.7 brotes por embrión.

A partir de los 75 días de la siembra, el tejido se disgregó y presentó diminutos brotes que le dieron aspecto nodular, algunos de los cuales alcanzaron hasta 10 mm. Posterior a este tiempo, numerosos brotes presentaron problemas de oxidación, lo cual impidió que continuaran su desarrollo.

Después de la transferencia al medio de alargamiento, y transcurridos 140 días de la siembra inicial en el medio de inducción, el promedio de brotes por embrión fue de 4.4, donde la longitud de los brotes osciló de 1 a 10 mm. El mayor porcentaje de los brotes obtenidos (86%) presentó 1mm, y sólo el 11% alcanzó 5-10 mm, tamaño mínimo necesario para individualizarlos e intentar su enraizamiento.

***b) SH+K 5 mgL<sup>-1</sup> (60 días de inducción)***

- *Semillas de "El Ranchito" colectadas en 1993*

A los 60 días de inducción el 20.6% de los embriones (24/116) presentaron un escaso número de primordios de brotes y brotes diferenciados. A los 90 días el promedio de brotes por embrión no superó los 2.2, promedio que se mantuvo prácticamente después de 140 días de cultivo ya en el medio de alargamiento (2.5 brotes/embrión). De éstos, el 72% presentaron una longitud de 1 a 2 mm, y sólo el 28% de los brotes alcanzó de 3 a 10 mm.

- *Semillas de "El Ranchito" colectadas en 1997*

El 97.5% de los embriones presentaron alguna respuesta morfogénica, pero sólo cerca del 49% (39/80) formaron brotes. Los tejidos también presentaron algunos signos de oxidación, pero en menor proporción que en 30 días de inducción y sin que afectara al desarrollo de los brotes.

A los 90 días de cultivo, ya en el medio de proliferación, el promedio de brotes por embrión fue de 9.1, sin embargo los brotes aún eran diminutos pues el 84% de ellos presentó 2 mm de longitud y el resto alcanzó los 3 a 5 mm. En esta etapa sólo se registró un brote con 1 cm de altura.

A los 140 días de cultivo, en el medio de alargamiento aún se presentaron algunos primordios de brotes, sin embargo, la mayoría fueron brotes adventicios diferenciados, cuya longitud fluctuó entre los 2 y 14 mm.

Durante el crecimiento de los brotes se observó el desarrollo de nuevas hojas en el ápice de los mismos, así como la elongación y un ligero cambio en la coloración de las hojas previamente formadas (Figura 18a). Los brotes continuaron su desarrollo unidos a los tejidos del explante original formando densos cúmulos de brotes de disposición muy apretada, a los cuales se evitó individualizar mecánicamente para evitar dañarlos con el bisturí (Figura 18b-c). La individualización de los brotes se realizó, con la ayuda de un bisturí, hasta que fue posible distinguir los límites de un tallo y otro, o bien, hasta que su separación fue natural producto de la manipulación durante los subcultivos (Figura 18d-e). Cabe señalar que la producción de brotes en los embriones utilizados como explantes fue finita, es decir, que los cúmulos de brotes al ser subcultivados nunca entraron en el proceso de dediferenciación y rediferenciación celular que permitiera generar nuevos brotes, como sucede en otros grupos vegetales cultivados *in vitro*, donde se presenta el fenómeno de habituación.

Al igual que en los tratamientos anteriores, la mayor proporción de brotes permaneció de tamaño pequeño (71%, 2-3mm) y solo el 29% alcanzó de 4 a 14 mm, tamaño adecuado para realizar cualquier prueba de enraizamiento. Al final de la evaluación, en este tratamiento el promedio de brotes por embrión fue significativamente superior (18.1) a los procedentes del mismo lote (semillas colectadas en 1997) pero cultivados con 30 días de inducción (4.4), y a los otros dos tratamientos de inducción donde se utilizaron las semillas después de 6 años de cosecha (1993).

Al realizar el análisis de varianza para el número de primordios de brotes y brotes obtenidos en medio SH+K 5 mgL<sup>-1</sup>, procedentes de la misma población pero diferente año, y utilizando dos tiempos de inducción, indicó diferencias significativas para ambos (Tabla XII).

Los resultados de la prueba de Tukey para el número de primordios de brotes revelaron que el mejor tratamiento fue con 30 días utilizando los embriones más recientes (1997), y aparentemente con resultados contrarios a los del tratamiento con 60 días de inducción con semillas procedentes del mismo año (1997), sin embargo hay que tomar en cuenta que en este último caso, el número de primordios de brotes presentes fue muy escaso ya que, al haber pasado mayor tiempo de cultivo (60 días de inducción + 30 días en el medio de proliferación) la mayoría de éstos se habían diferenciado en brotes y se contabilizaron como tales (Tabla XIII).

Tabla XII. Análisis de varianza para el número de primordios de brotes (< 1 mm) y brotes (1-5 mm) obtenidos en embriones maduros de *P. chihuahuana* cultivados en medio SH+K 5 mgL<sup>-1</sup> utilizando dos tiempos de inducción (30 y 60 días) y procedentes de dos años de cosecha (1993 y 1997). Datos obtenidos después de 90 días de cultivo.

	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Significancia P>F
Primordios de Brotes (< 1 mm)	3	968.171	322.724	77.454	.000
Brotes	3	922.043	307.348	29.419	.000

La prueba de Tukey para el número de brotes diferenciados corroboró que el mejor tratamiento para la formación de brotes fue en el que se utilizaron los embriones obtenidos de semillas con menor tiempo de almacenamiento (2 años) y proporcionando un mayor tiempo de inducción (60 días) (Tabla XIV). Hay que señalar que el aspecto de los brotes fue vigoroso y con mayor número de hojas comparado con los otros tratamientos.

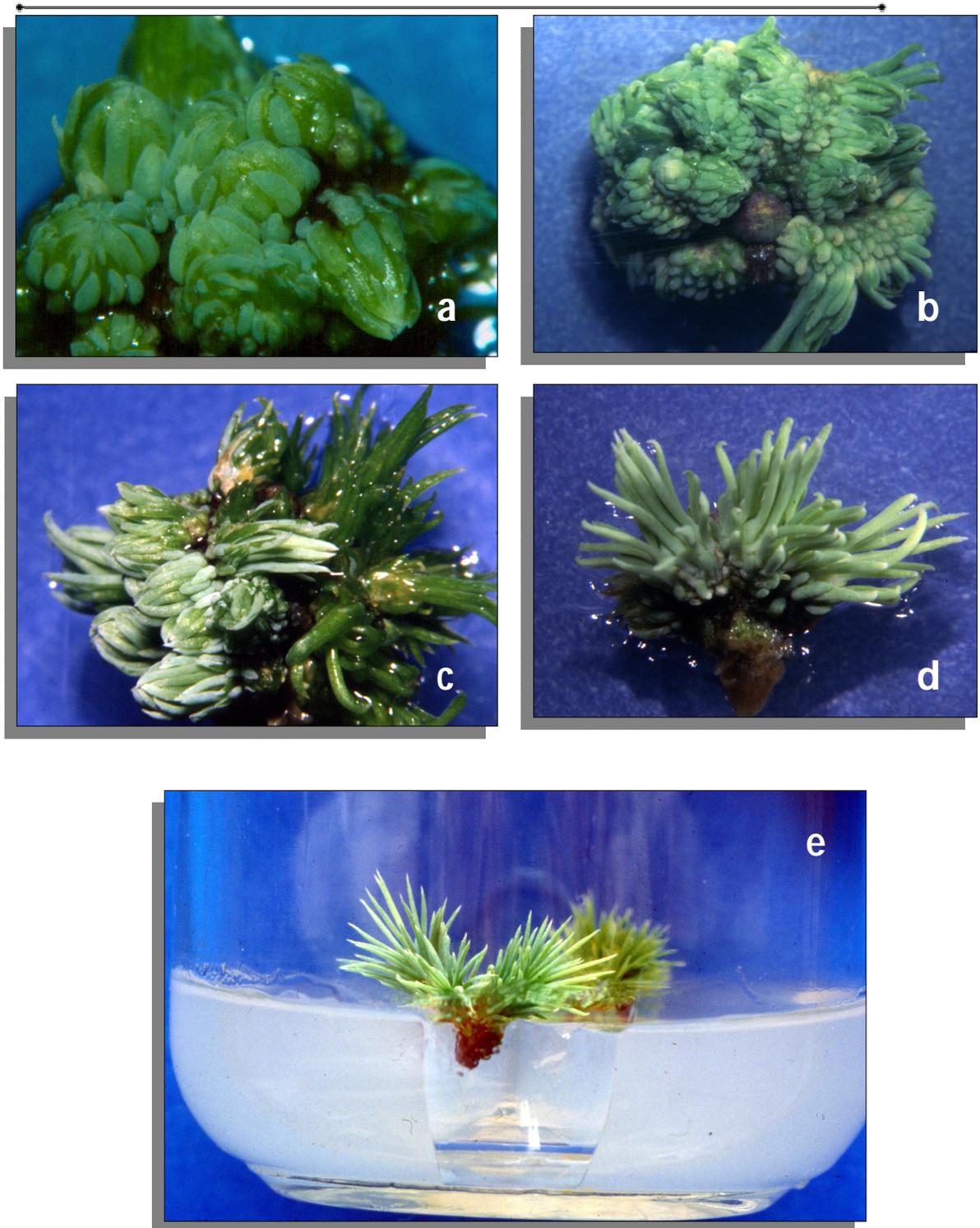


Fig. 18a-e. Los brotes continuaron su desarrollo en el medio de proliferación (SH 50%) y alargamiento (SH 50%, carbón activado 3 gL<sup>-1</sup>, sacarosa 20 gL<sup>-1</sup>) que se evidenció por el aumento de tamaño y crecimiento de las hojas hasta alcanzar una longitud aproximada de 1.5 cm.

Tabla XIII. Prueba de Tukey HSD para el número de primordios de brotes (< 1 mm) obtenidos en embriones maduros de *P. chihuahuana* cultivados en medio SH+K 5mgL<sup>-1</sup> utilizando dos tiempos de inducción (30 y 60 días) y procedentes de dos años de cosecha (1993 y 1997). Datos obtenidos después de 90 días de cultivo.

Tiempo de inducción/año	n	Medias	Grupos homogéneos
60d/R-97	80	.00	a
30d/R-93	140	.05	a
60d/R-93	116	.32	a
30d/R97	80	3.99	b

R-93 (El Ranchito 1993)  
R-97 (El Ranchito 1997)

Tabla XIV. Prueba de Tukey HSD para el número de brotes (1-5 mm) obtenidos en embriones maduros de *P. chihuahuana* cultivados en medio SH+K 5mgL<sup>-1</sup> utilizando dos tiempos de inducción (30 y 60 días) y procedentes de dos años de cosecha (1993 y 1997). Datos obtenidos después de 90 días de cultivo.

Tiempo de inducción/año	n	Medias	Grupos homogéneos
60d/R-93	116	.36	a
30d/R-93	140	.68	a
30d/R-97	80	1.19	a
60d/R-97	80	4.38	b

R-93 (El Ranchito 1993)  
R-97 (El Ranchito 1997)

De acuerdo a los resultados obtenidos, en el cuadro 6 se hace un resumen de la propuesta metodológica para la propagación *in vitro* de esta conífera en peligro de extinción

Cuadro 6. Metodología propuesta para la obtención de brotes *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez.

MEDIO	PROCEDIMIENTO
<i>Inducción</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SH + K (5 mgL<sup>-1</sup>)</li> <li>• Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup></li> <li>• Antioxidantes en el medio (ácido cítrico + ácido ascórbico 250 mgL<sup>-1</sup>)</li> <li>• pH 5.7-5.8</li> <li>• Agar-agar (Merck®) 5.5 gL<sup>-1</sup></li> <li>• 25±2 °C, 16 h luz, 40.5-47.25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (3000-3,500 lux)</li> <li>• Enjuague de embriones 30 min en la solución antioxidante</li> <li>• Tiempo de inducción: 60 días</li> </ul>
<i>Proliferación</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SH (macros y micros al 50%)</li> <li>• Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup></li> <li>• Sin antioxidantes en el medio</li> <li>• pH 5.7-5.8</li> <li>• Agar-agar (Merck®) 5.5 gL<sup>-1</sup></li> <li>• 25±2 °C, 16 h luz, 40.5-47.25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (3000-3,500 lux)</li> <li>• Enjuague de embriones 30 min en la solución antioxidante</li> <li>• Un subcultivo (3-4 semanas)</li> </ul>
<i>Alargamiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SH (macros y micros al 50%)</li> <li>• Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup></li> <li>• Carbón activado 3 gL<sup>-1</sup></li> <li>• Sin antioxidantes en el medio</li> <li>• pH 5.7-5.8</li> <li>• Agar-agar (Merck®) 5.5 gL<sup>-1</sup></li> <li>• 22 °C, 16 h luz, 40.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (3000 lux)</li> <li>• Enjuague de explantes con brotes menores a 5mm 10-15 minutos en la solución antioxidante</li> <li>• Brotes mayores a 5 mm sin baño de antioxidantes</li> <li>• Subcultivos cada 3-4 semanas</li> </ul>

## 2. Análisis estructural

En los embriones maduros cultivados *in vitro* de *P. chihuahuana*, los cotiledones fueron las estructuras que presentaron la mayor respuesta morfogénica, mientras que en el hipocótilo la respuesta fue muy escasa o nula, tal como lo reportó López (2000) para la misma especie. En la mayoría de las coníferas propagadas por cultivo de tejidos por medio de embriones cigóticos se reporta a los cotiledones como las estructuras con mayor capacidad regenerativa, sin embargo en algunas especies, como en *Pseudotsuga macrolepis*, los brotes se originaron tanto de los cotiledones como del hipocótilo (García, 2003).

En un embrión cigótico de conífera, todas las estructuras están delimitadas por una protodermis (Krasowski y Owens, 1993). Las células epidérmicas del embrión control fueron de forma cúbica y sin espacios intercelulares, con grandes núcleos, citoplasma denso y granular, con pequeñas vacuolas, y donde no se observan divisiones mitóticas. Después de 15 días en el medio SH sin reguladores del crecimiento se observaron zonas de actividad celular hacia la región de los cotiledones (Figura 19a). Las pruebas histoquímicas con PAS hicieron evidentes gránulos de almidón y numerosos gránulos proteicos distribuidos de manera irregular, siendo más densos en la zona de inserción de los cotiledones con el hipocótilo (19b). Se ha sugerido que la presencia de almidón puede ser un requisito previo a la organogénesis, tal y como fue reportado para *Pinus coulteri*, donde éste fue observado antes de la formación de brotes (Patel y Berlyn, 1983). En cotiledones de *Pinus radiata*, también se observaron abundantes granos de almidón al inicio del cultivo, los que posteriormente fueron metabolizados cuando se inició la formación de centros organogénicos (Patel y Thorpe, 1984 citados por Thorpe y Kumar, 1993).

En un la región basal del hipocótilo se observó que las células parenquimáticas presentaron núcleos prominentes y fueron en su mayoría rectangulares-alargadas, con escasos espacios intercelulares entre ellas y dispuestas a manera de filas ordenadas a lo largo del eje del hipocótilo-radícula (19c). En el extremo opuesto (19d) las puntas de los cotiledones se observan ligeramente

alargadas con cierta actividad meristemática evidenciada por la tinción safranina-verde rápido (S-VR) que mostraron algunas células isodiamétricas con núcleos grandes; hacia la parte media de los cotiledones las células fueron más grandes de borde irregular y vacuoladas, en algunas no se observaron núcleos o bien, se observaron desplazados hacia la periferia.

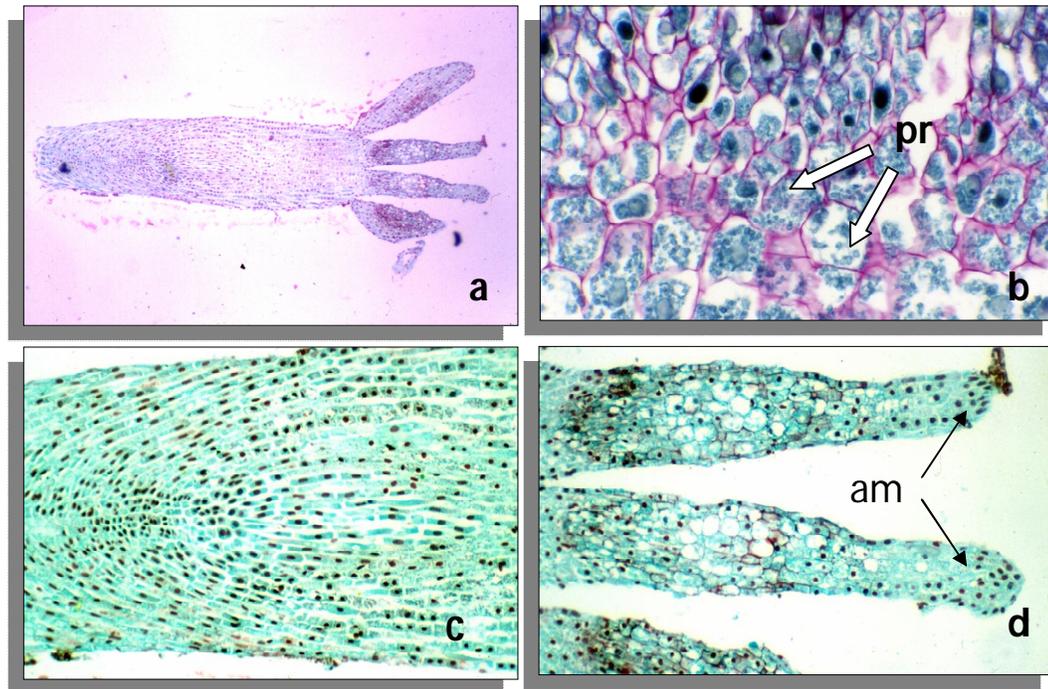


Fig. 19. **a)** Corte longitudinal del embrión multicotiledonario control después de 15 días en medio SH (PAS, 25X); **b)** gránulos proteicos (pr) en la zona de inserción de los cotiledones con el hipocótilo (PAS, 40X); **c)** región del hipocótilo-radícula y **d)** cotiledones elongados con actividad meristemática (am) en la punta (S-VR, 10X).

Cortes longitudinales de los embriones después de 30 días de inducción en los tres diferentes medios de cultivo (B5 modificado, MS y SH) y en la mejor combinación hormonal ( $K\ 5\text{mgL}^{-1}$ ), mostraron claras diferencias en la organización de los tejidos (Figura 20). En los tres medios la periferia de los cotiledones presentó intensa actividad meristemática tiñéndose fuertemente. Las divisiones mitóticas estuvieron principalmente ubicadas en la capa epidérmica y las tres a cuatro capas subyacentes, corroborando que durante el cultivo *in vitro*

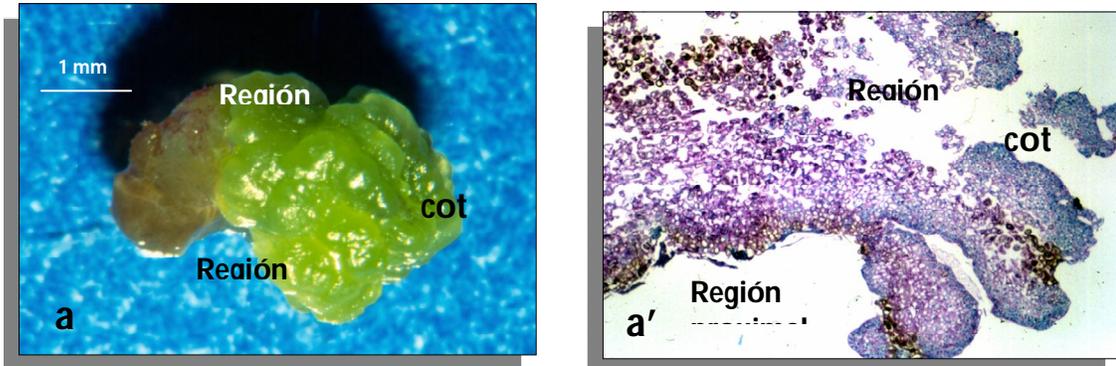
y en presencia de la citocinina los cotiledones fueron las estructuras que más tardaron en perder su diferenciación celular, a diferencia del hipocótilo.

En el medio B5 modificado (20a y 20a') y en MS (20b y 20b') los embriones morfológicamente se observan como estructuras turgentes, pero aún organizadas, sin embargo el corte histológico demostró que la dediferenciación celular, necesaria para dar respuesta a la formación de nuevas estructuras *in vitro*, ocurrió de manera interna en el eje del hipocótilo, donde hubo grandes espacios entre las células y éstas perdieron su forma rectangular y alineación característica.

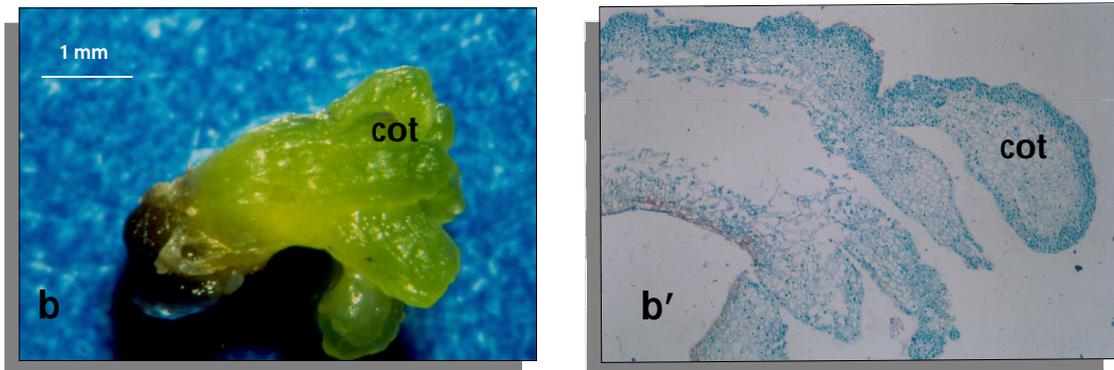
En el medio SH (20c y 20c') los embriones presentaron tejidos más compactos y organizados, tanto en los cotiledones como a lo largo del eje del hipocótilo, con mayor actividad meristemática en la periferia de los cotiledones comparada con la del hipocótilo, lo que derivó en una mayor respuesta organogénica.

Por lo anterior, los embriones procedentes de cultivos en el medio SH fueron los seleccionados para ser deshidratados e incluidos en Paraplast.

### B5 modificado



### MS



### SH

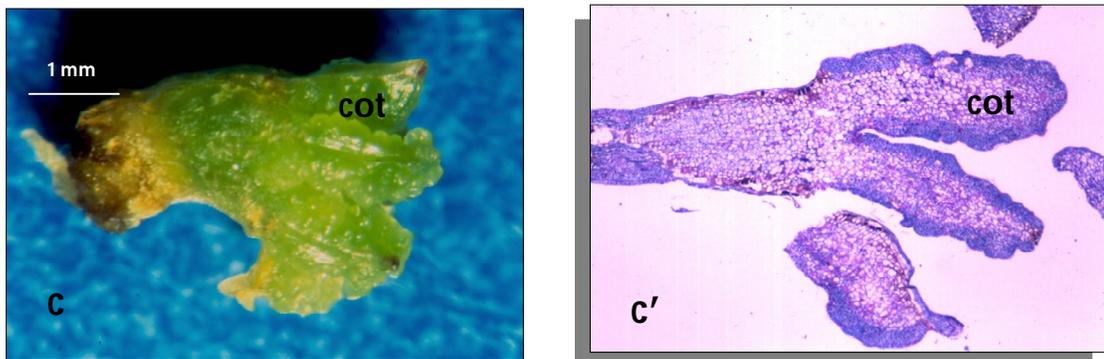


Fig. 20. Aspecto morfológico e histológico de los embriones después de 30 días en los medios de inducción B5 modificado (a, a'), MS (b, b') y SH (c, c') con K 5 mgL<sup>-1</sup>. La actividad meristemática se concentra principalmente en la periferia de los cotiledones (cot), siendo en el medio SH donde los tejidos permanecieron más organizados y fueron más regenerativos. Tinción PAS (25 X).

Se identificaron histológicamente algunas de las estructuras que se formaron en los embriones durante el cultivo *in vitro*:

Durante las etapas iniciales del cultivo se observaron sobre los cotiledones numerosas y diminutas protuberancias meristemáticas en forma de domo mientras que el hipocótilo adquirió cierta curvatura con respecto a la superficie del medio y la parte dorsal mostró crecimiento (Figura 21a). En un corte longitudinal, se observó actividad meristemática en las células epidérmicas y subepidérmicas de los cotiledones, principalmente en su periferia. La coloración rojiza que presentaron los explantes en los cotiledones y el hipocótilo, en la parte proximal en contacto con el medio, pero principalmente en la zona distal, fueron taninos que tienden a acumularse en las células y cuya presencia ha sido reportada durante el cultivo *in vitro* en otras coníferas, como en el caso de *Pseudotsuga menziesii* donde fueron observados en los cotiledones, callo y células en suspensión (Cheah y Cheng, 1978; García, 2003) (21b).

En un acercamiento de los cotiledones (21c-21f) se distingue que los pequeños domos están formados por células típicas meristemáticas: pequeñas, isodiamétricas y de núcleos centrales muy grandes intensamente teñidos, al igual que el citoplasma denso. El arreglo de estas células en la epidermis fue organizado y continuo, con una fina cutícula cubriéndola, mientras que en las capas subyacentes, las células meristemáticas se dispusieron en forma de hileras verticales. La intensa actividad celular fue evidente al observar el contenido nuclear en el que se ven diminutos gránulos rojos que corresponden al material genético reorganizándose para dar lugar a subsecuentes divisiones mitóticas anticlinales en la epidermis (21g) que le permitieron el crecimiento en grosor del domo, y divisiones mitóticas periclinales en la primera capa subepidérmica (21h) que le permitieron el aumento de volumen. El resto de las células de los cotiledones fueron parenquimáticas, grandes, con paredes celulares delgadas, de bordes irregulares y núcleos pequeños desplazados hacia la periferia de las células por la presencia de grandes vacuolas.

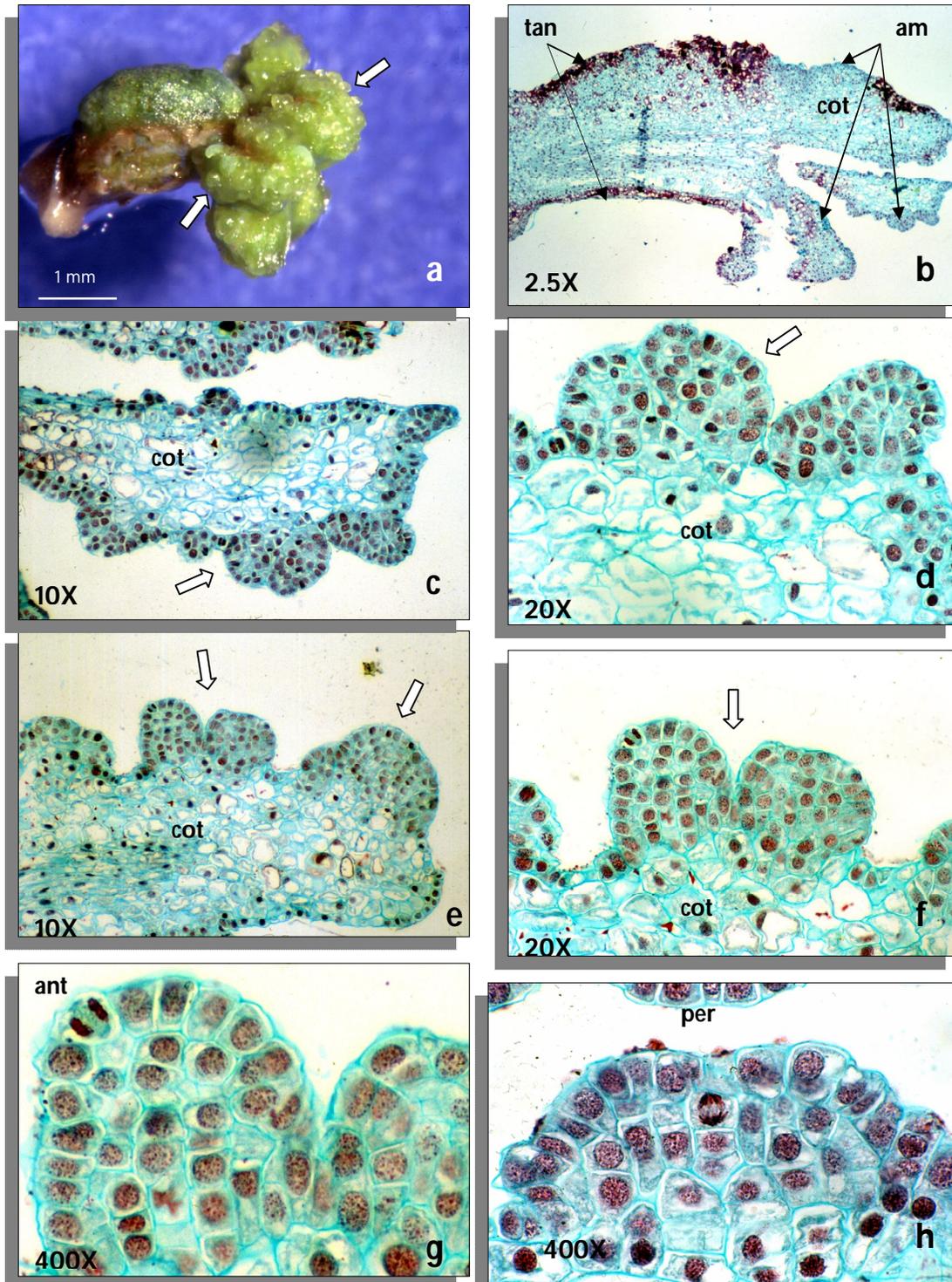


Fig. 21. **a**) Embrión de 30 días en medio de inducción (SH K 5 mgL<sup>-1</sup>) con cotiledones cubiertos de diminutas protuberancias (⇒); **b**) actividad meristemática (am) en la periferia del embrión concentrada en los cotiledones (cot) y presencia de taninos (tan) en su parte distal y proximal; **c-f**) detalle histológico de los cotiledones (cot) y las protuberancias (⇒) conformadas por células típicas meristemáticas caracterizadas por los enormes núcleos centrales y citoplasma, ambos densamente teñidos; **g**) divisiones anticlinales (ant) en la epidermis y **h**) periclinales (per) en la subepidermis que les permitieron el crecimiento en grosor y volumen respectivamente. Tinción S-VR.

Los cortes revelaron que el origen de los brotes adventicios en *P. chihuahuana* fue por organogénesis vía directa a partir de las células de la epidermis y capas celulares subyacentes inmediatas. Éstas, ante la influencia de los tratamientos ensayados, entraron en actividad mitótica (ciclos de división celular) permitiendo que las células de la epidermis y subepidermis conformaran las citadas protuberancias que emergieron de la superficie de los cotiledones como estructuras que pudieron dar origen a los meristemas apicales que se desarrollaron en brotes, sin embargo, la formación de los pequeños domos no garantizó que todos ellos se desarrollaran, y es posible que quedaran como meristemas latentes y no todos culminaran en brotes adventicios.

El análisis histológico de los brotes adventicios en cotiledones jóvenes de *Pseudotsuga mensiezii* fue realizado por Cheah y Cheng (1978). Ellos detectaron la formación de centros meristemáticos en la región epidérmica de los explantes a los que llamados "meristemoides", los que después se transformaron en pequeños domos conformados de células meristemáticas a los que llamaron "primordios de brotes" los cuales fueron ya evidentes a simple vista a diferencia de los meristemoides que solo pudieron ser observados en los cortes. Etapas posteriores en el desarrollo de los brotes adventicios mostraron un domo apical (meristemo apical del brote) flanqueado por un par de primordios foliares, los que continuaron su desarrollo formando varias capas de hojas que envolvieron al ápice del brote.

En *Pinus radiata*, Thorpe y Kumar (1993) denominaron "promeristemoides" a las estructuras previas a la formación de los brotes, y que se originaron en las células inmediatamente por debajo de la epidermis. La primera división de tales células "madre" fue periclinal y, subsecuentemente, por medio de continuas divisiones periclinales y anticlinales se condujo a la formación de estructuras esféricas-ovales de seis a ocho células después de cinco días de cultivo con una citocinina.

Aún cuando los estudios histológicos del desarrollo de los brotes por cultivo de tejidos en coníferas son relativamente escasos, y datan principalmente

de la década de los 90's, en varias investigaciones se reporta la aparición de dichos promeristemoides como las estructuras previas que posiblemente den origen a los brotes adventicios, sin embargo, hasta la fecha no hay imágenes de la secuencia continua de los eventos de transición de un promeristemoide a brotes que lo corroboren.

En cotiledones de los embriones cigóticos maduros de *P. chihuahuana* también se registró una secuencia de eventos muy similar a lo reportado anteriormente, que posiblemente condujo a la formación de los brotes adventicios en esta especie. A los 30 días de inducción, sobre la superficie de los cotiledones, las primeras divisiones celulares fueron observadas en la primera capa por debajo de la epidermis y, a diferencia de lo reportado en *Pinus radiata* por Thorpe y Kumar (1993), en *P. chihuahuana* ocurrieron simultáneamente divisiones periclinales y anticlinales (Figura 22a). Posteriores divisiones celulares periclinales o anticlinales condujeron a la formación de una estructura de cuatro células delimitada por aparentes paredes celulares de mayor grosor que las del resto del mesófilo, característica que adquieren por la presencia de un citoplasma muy denso. La actividad meristemática estuvo confinada a las tres primeras capas celulares, incluyendo a la epidermis (22b). En *P. chihuahuana*, las divisiones periclinales, anticlinales y oblicuas dieron origen a promeristemoides bien delimitados de tres a cinco células, y posiblemente hasta de seis (22c-22f), aunque en otras especies, como *Pinus radiata*, se registraron grupos de hasta de 8 células (Thorpe y Kumar, 1993). De manera similar, agrupaciones de tres o cuatro células formadas a partir de divisiones anticlinales, seguidas de periclinales y oblicuas, fueron observadas a los tres días de cultivo en las primeras capas subyacentes a la epidermis en cotiledones de *Pinus strobus*, *Pinus ponderosa* y *Pinus radiata* (Villalobos *et al.*, 1985; Flinn *et al.*, 1988 y Webb y Flinn, 1991). La actividad meristemática y formación de promeristemoides ocurrió en ambas superficies del cotiledón, ya sea en contacto o no con el medio de cultivo (22g). Las células que conformaron a los promeristemoides presentaron también núcleos grandes y citoplasma denso. En *P. radiata* se reportó la presencia de plasmodesmos que conectaban a las células dentro de los promeristemoides, sin

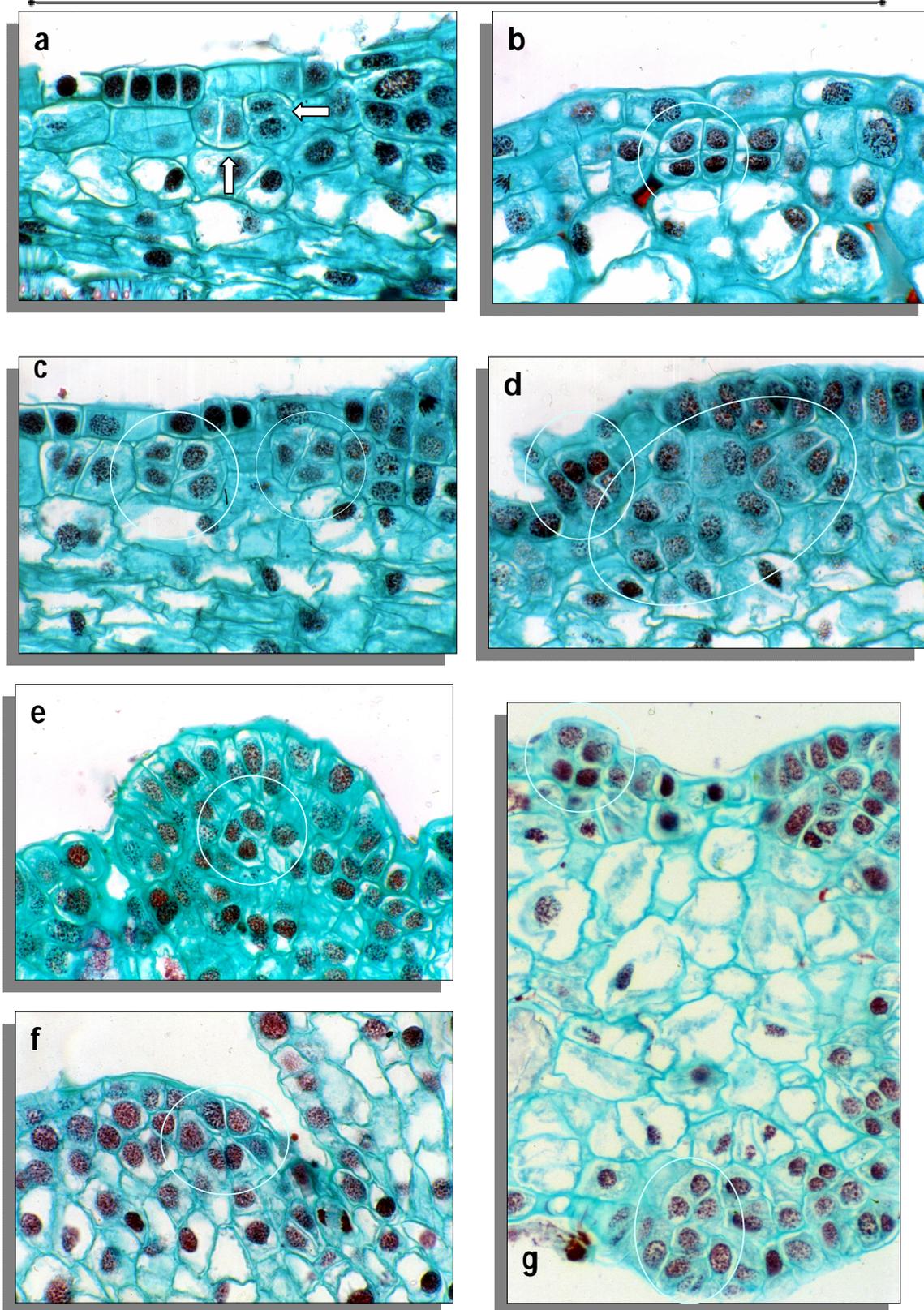


Fig. 22. Desarrollo de promeristemoides en cotiledones de *P. chihuahuana* a los 30 días en el medio de inducción: **a)** divisiones anticlinales ( $\uparrow$ ) y periclinales ( $\rightleftharpoons$ ) simultáneas en la primera capa subepidérmica; **b)** estructura de cuatro células delimitada del resto del tejido y escasos espacios intercelulares; **c-f)** divisiones periclinales, anticlinales y oblicuas dieron origen a promeristemoides de tres a seis células; **g)** promeristemoides en desarrollo en ambas superficies del cotiledón. (400x) Tinción S-VR.

embargo estuvieron ausentes entre ellos, lo que sugiere que actúan como estructuras independientes uno del otro y del tejido que los rodea.

Después de 75 días de cultivo (30 días en el medio de inducción + 45 días en el medio de proliferación) fueron visibles domos meristemáticos flanqueados con su primer par de primordios foliares (Figura 23a) y ápices meristemáticos con varios primordios foliares. Conforme los brotes continuaron su desarrollo, los primordios foliares fueron elongándose, producto de divisiones anticlinales (23b), y madurando en hojas, al mismo tiempo que se formaron otros primordios foliares nuevos que emergieron del meristemo apical (23c), al mismo tiempo que el tallo se conformaba en una estructura diferenciada para permitir el desarrollo de brotes completos (23d). En los cortes histológicos de los brotes no se observaron haces vasculares, pero sí la presencia de procambium que más tarde se diferenciaría en éstos.

El desarrollo de los brotes fue asincrónico, así pues, en un mismo explante fue posible detectar varias etapas del desarrollo de los mismos.

A diferencia de lo reportado para otras especies de coníferas, en este experimento la aparición de los promeristemoides en *P. chihuahuana* requirió de mayor tiempo de inducción (al menos 30 días), a diferencia de otras especies en los que dichas estructuras fueron detectadas desde los tres a cuatro días (Villalobos *et al.*, 1985; Flinn *et al.*, 1988 y Webb y Flinn, 1991). Los promeristemoides están relacionados con la competencia morfogenética de los tejidos, es decir, la capacidad para formar un mayor número de brotes dependiendo del tiempo de exposición del explante a los reguladores del crecimiento (López, 2000). Es posible que al ser *P. chihuahuana* una especie relictual de difícil propagación convencional, ya sea por semillas o vegetativa, esto se vea reflejado en su lenta y baja capacidad para regenerar brotes *in vitro*.

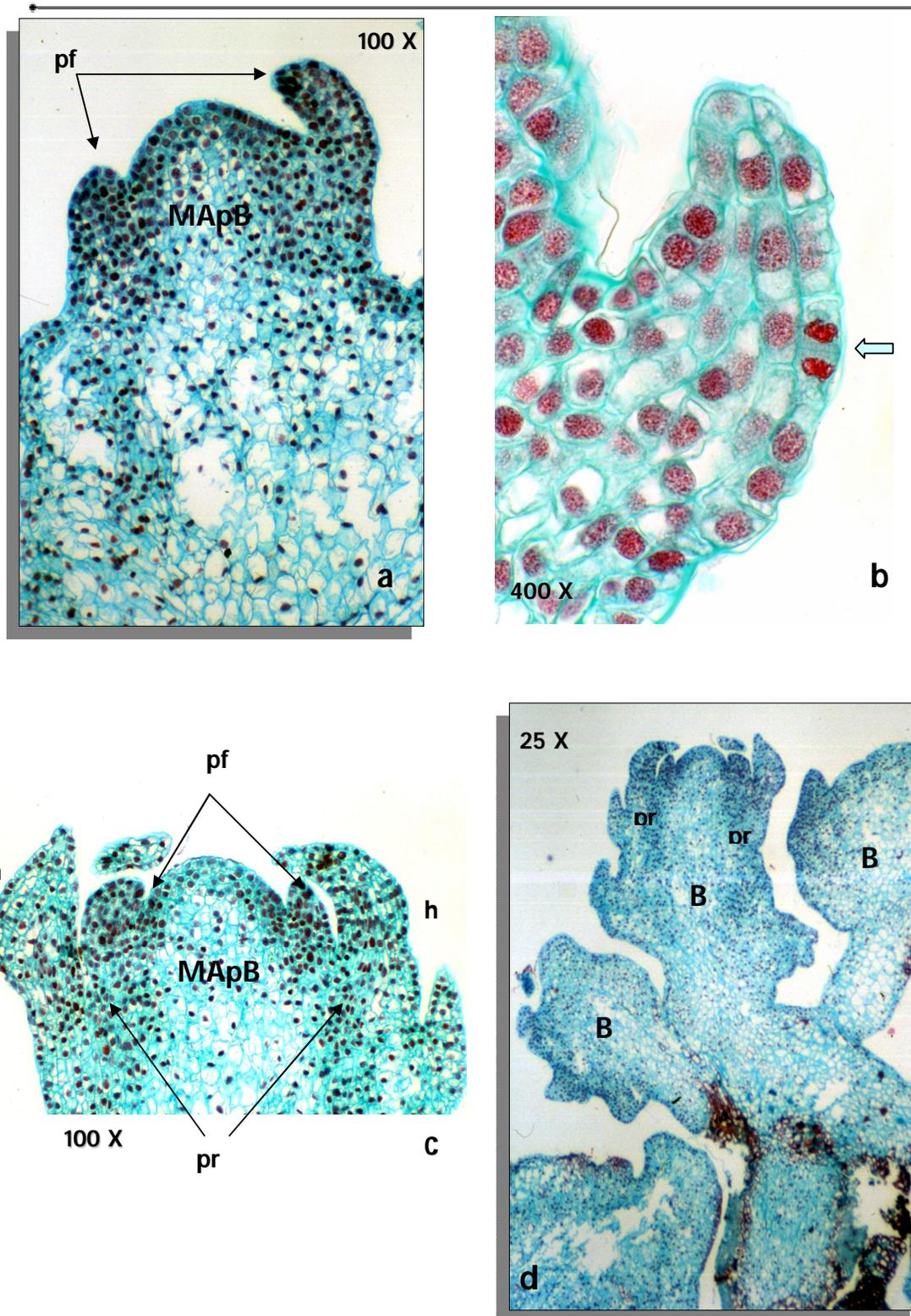


Fig. 23. Desarrollo de los brotes adventicios de *P. chihuahuana* : **a**) corte longitudinal del meristemo apical de un brote (MApB) con sus primeros primordios foliares (pf) los que, **b**) fueron elongándose y diferenciándose por divisiones anticlinales en sus células epidérmicas ( $\Leftrightarrow$ ) madurando en hojas; **c**) ápice de un brote (MApB) con primordios foliares (pf), hojas jóvenes (h) y posible procambium (pr); **d**) tres brotes (B) en desarrollo a los 75 días de cultivo *in vitro*, unidos al explante, el central en corte longitudinal y en ambos lados en corte tangencial. S-VR.

### ***Comentarios finales***

Se ha demostrado que el cultivo de tejidos vegetales resulta una técnica de propagación eficiente en coníferas y otras gimnospermas. El interés para el establecimiento de metodologías que conlleven a su multiplicación *in vitro* es muy alto desde hace varias décadas debido a que los bosques están siendo talados más rápido de lo que están siendo regenerados, ya sea natural o artificialmente, a causa de la creciente demanda de madera y otros productos maderables. Es posible que las especies de coníferas más trabajadas *in vitro* sean las del género *Pinus*, sin embargo dada la importancia comercial que tienen, varias especies de *Picea* también lo son.

Las vías de regeneración más reportadas en coníferas son principalmente la brotación de yemas axilares, la producción de brotes adventicios por organogénesis y, la formación de embriones somáticos, siendo las dos últimas aquellas que han permitido la producción de plantas en más de 50 especies de gimnospermas. No obstante, la embriogénesis somática no deja de ser la que tiene mayor potencial regenerativo y ventajas para la obtención de estructuras bipolares que no requerirán de una fase de enraizamiento (Thorpe *et al.*, 1990 citados por Thorpe y Harry, 1991).

Si bien ha sido posible obtener plantas en un gran número de estas especies, se sabe también que las especies leñosas han sido difíciles de cultivar *in vitro* y que la regeneración a gran escala no ha sido posible para la mayoría de ellas.

*Picea chihuahuana* es una especie con el potencial de ser propagada por cultivo de tejidos, lo cual fue demostrado en los trabajos previos realizados como parte del mismo proyecto al cual pertenece esta tesis. No obstante los cultivos fueron iniciados utilizando tejidos jóvenes, embriones cigóticos inmaduros (Mata, 2000) y embriones maduros (López, 2000; Sánchez, 2001), incluyendo el presente trabajo, la única vía de regeneración posible fue la obtención de brotes adventicios por organogénesis directa, los cuales se formaron casi exclusivamente en el área de los cotiledones, no logrando en

ninguno de los casos la inducción de embriones somáticos, respuesta frecuente en otras especies de pinos, favorecida por sus características poliembriónicas.

La formación de brotes adventicios (tallos) fue observada en la mayoría de los experimentos ensayados, sin embargo, se puede decir que para la especie trabajada, el número de brotes por explante obtenidos estuvo por debajo de lo reportado para otras especies del mismo género; esto sumado a que los tiempos de respuesta organogénica también fueron mayores. Es muy posible que *P. chihuahuana* requiera tiempos de inducción más largos, es decir, que los explantes deberán permanecer más tiempo en el medio con reguladores del crecimiento antes de su transferencia a un medio básico para la proliferación y elongación de los brotes inducidos. Al ser considerada una especie relictual, lo anterior puede ser un reflejo *in vitro* de su limitada capacidad regenerativa natural, lo cual finalmente repercute en su bajo potencial de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, ya que se sabe que la habilidad para enraizar está altamente influenciada, además del genotipo, por la juvenilidad de las plantas madre (von Arnold, 1988).

La formación de raíces en *P. chihuahuana* se reportó prácticamente como nula, y de los escasos eventos ninguno fue posible establecerlo *ex vitro*. Los estudios al respecto deberán en el futuro probar otras alternativas tales como la combinación de auxinas con otros compuestos con efecto fitorregulador tales como las cumarinas, efectivas en *Pinus sylvestris* (Bornman y Jansson, 1980 citados por von Arnold, 1988), o bien, la inoculación de *Agrobacterium rhizogenes* o la micorrización *in vitro* de los brotes enraizados (Caro *et al.*, 2000; Galindo, 2004). Una vez logrado en enraizamiento, serán necesarios los estudios histológicos correspondientes para corroborar la conectividad de los haces vasculares de las raíces con los de los brotes para asegurar su funcionalidad.

Si bien, la propagación de *P. chihuahuana* vía embriogénesis somática podría ser la mejor alternativa para la recuperación de esta especie en peligro de extinción, lo cual permitiría la obtención de estructuras bipolares enraizadas que tendrían que pasar solamente por la fase de aclimatización previo a su traslado al

campo, no deben dejarse a un lado las técnicas convencionales de propagación, principalmente utilizando semillas para el establecimiento de viveros para asegurar la sobrevivencia de las plántulas, las cuales pueden ser transferidas posteriormente ya sea a su hábitat natural, o bien, a espacios donde se sabe que existieron poblaciones donde la especie habitó algún tiempo antes de su desaparición. Dada la problemática que presentan sus poblaciones con respecto a la plaga de la palomilla *Cydia phyllisi* que consumen las semillas de *P. chihuahuana*, resulta indispensable que las instituciones correspondientes continúen con las campañas para su erradicación ya que, al no contar con semillas sanas, los intentos de propagación *in vitro* o por técnicas convencionales podrían ser infructuosos.

## CONCLUSIONES

- Se logró el establecimiento de los cultivos y la inducción de brotes adventicios a partir de embriones cigóticos maduros de *Picea chihuahuana*.
- La presencia de luz influyó y favoreció la diferenciación de los brotes.
- Fue necesaria la presencia de citocininas en el medio de cultivo para la sobrevivencia de los explantes y para la formación de brotes adventicios.
- En el ensayo 1 (medio B5 modificado) los mejores tratamientos fueron K/2,4-D 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> y BA/ANA 5/0.5 mgL<sup>-1</sup> en condiciones de luz.
- En el ensayo 2 (medios B5 modificado, MS y SH), los mejores tratamientos fueron al utilizar medio SH adicionado con K/2,4-D 5/0.1 mgL<sup>-1</sup> y SH adicionado con BA 5 mgL<sup>-1</sup>.
- Las semillas de cosecha reciente (2 años de almacenamiento) del ensayo 3, dieron la mejor respuesta para la obtención de un mayor número de brotes de aspecto más vigoroso, lo que ocurrió en el medio SH + K 5 mgL<sup>-1</sup>, proporcionando 60 días de inducción.
- Bajo las condiciones de cultivo experimentadas, el medio nutritivo SH fue el que permitió el mayor desarrollo y número de brotes, los cuales mostraron un crecimiento vigoroso y poca oxidación.
- En los medios B5 modificado y MS los brotes también proliferaron, sin embargo la mayoría de ellos terminaron oxidados, lo que impidió que continuaran su desarrollo.
- Para el desarrollo óptimo de los brotes fue necesario iniciar la inducción en un medio con reguladores del crecimiento, principalmente citocininas, y posteriormente transferir los explantes a un medio con el 50% de sus compuestos inorgánicos (macro y microelementos).
- Para el control de la oxidación fue necesaria la incorporación de una mezcla de antioxidantes (ácido cítrico + ácido ascórbico) a los medios de

cultivo (de inducción y de proliferación), proporcionar a los explantes un baño con la solución antioxidante al momento de la siembra y en cada subcultivo, así como realizar transferencias periódicas a medio fresco.

- El análisis histológico corroboró que el medio SH los explantes mantuvieron sus tejidos compactos y organizados por más tiempo, permitiendo la formación de un mayor número de brotes adventicios.
- A los 30 días de inducción fueron visibles a simple vista estructuras forma de domo conformadas por células típicas meristemáticas que dieron aspecto nodular a los cotiledones del explante.
- En la capa epidérmica y las dos primeras capas subepidérmicas de los cotiledones de los explantes se formaron estructuras denominadas promeristemoides formados por grupos de 3 a 6 células meristemáticas delimitadas del resto de los tejidos por paredes celulares de mayor grosor.
- Brotes adventicios bien diferenciados fueron observados después de 75 días de cultivo.
- En *Picea chihuahuana*, la formación de brotes adventicios a partir de embriones cigóticos maduros fue casi nula en el hipocótilo y predominantemente ocurrió sobre los cotiledones del explante, originándose de estructuras derivadas de divisiones mitóticas en las dos primeras capas subyacentes a la epidermis.

## Anexo 1

### *Picea chihuahuana* Martínez

(Anales del Instituto de Biología, Vol. XIII, pág. 31, 1942)  
(Anales del Instituto de Biología, Méx. 19 (2): 393-405, 1948)

**Árbol** de 25 a 30 m de altura, con tronco de 45 a 70 cm de diámetro a la altura del pecho, con la corteza agrietada, de unos 20 mm de espesor y con la superficie escamosa, de color grisáceo por fuera y morena oscuro por dentro.

Las **ramas** inferiores comienzan desde 2 a 5 m de altura sobre el suelo y son casi horizontales, mientras que las superiores son extendidas o algo levantadas, formando una copa cónica. Las ramillas son opuestas, a veces bifurcadas, muy ásperas y de color amarillento con tinte rosado en sus partes tiernas, y oscuro en las adultas, las cuales se descaman a medida que envejecen.

Las **yemas** son terminales, en grupos de tres, ovoide-acuminadas, de 7 a 8 mm, con las brácteas apretadas, ovadas u ovales, de borde laciniado. En la base se observan otras brácteas pequeñas y largamente acuminadas.

Las **hojas** son solitarias, cuadrangulares, rectas o levemente falcadas, de color verde claro y de 15 a 21 mm de largo, más comúnmente de 17 a 19 por 1.7 mm de ancho, rígidas, con el ápice agudo, córneo y punzante; están colocadas sobre la prolongación de un cojinete recurrente de donde, en seco, se desprenden fácilmente; se encuentran dispuestas en espiral y se orientan hacia la extremidad de las ramillas. Se ven estomas en las cuatro caras, formando cuatro hileras en cada una, a veces 5 o 6, pero en este caso una o dos hileras son interrumpidas.

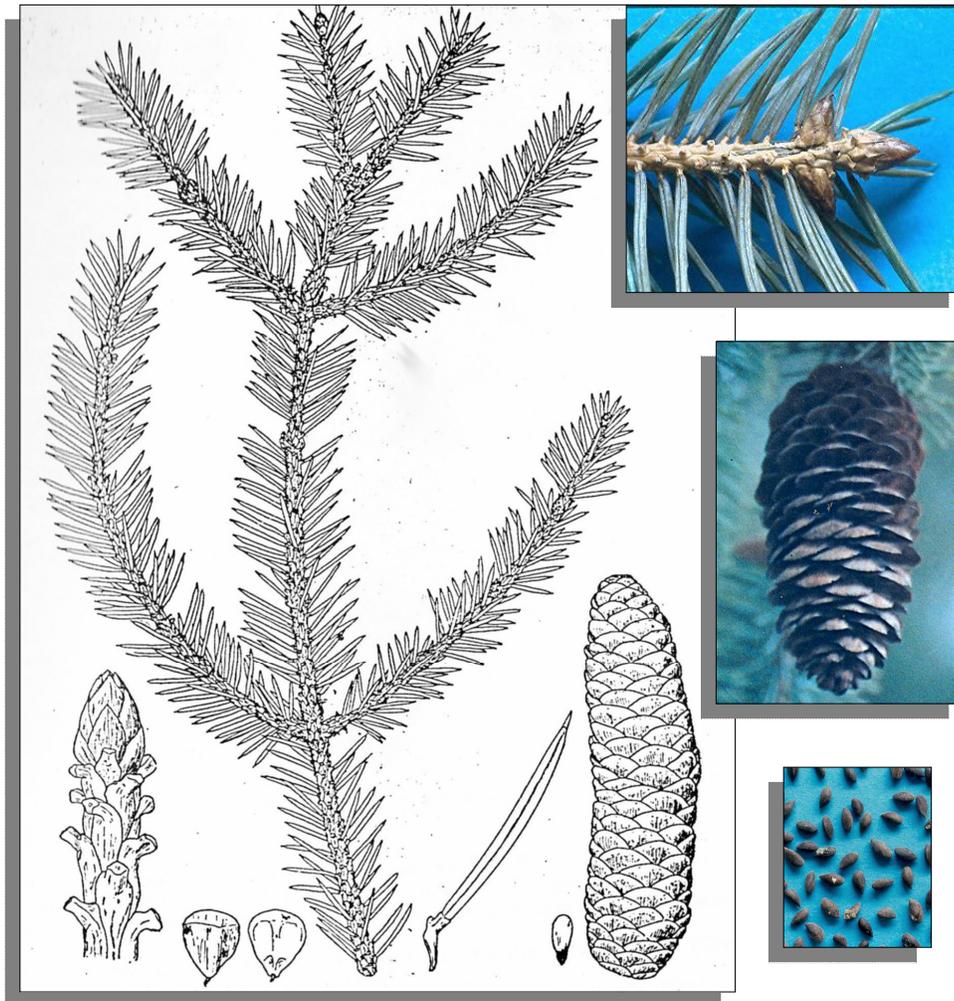
Los **conos** son terminales o subterminales en las ramas superiores, cilíndricos o cilíndrico-oblongos, rectos o algo encorvados, muy levemente atenuados en la extremidad y romos; colgantes, solitarios o por pares, a veces de 3 a 4, de color castaño brillante, miden de 10.5 a 14 cm de diámetro (abiertos), y están sobre pedúnculos fuertes encorvados, de unos 10 mm.

Las **escamas** son numerosas (unas 150 incluyendo una veintena de pequeñas e infértiles que pertenecen al ápice y a la base del cono); delgadas,

coriáceo-leñosas, persistentes; obovado-cuneadas, convexas hacia arriba, aplanadas y oscuras hacia la base, con el borde superior redondeado y entero; miden de 20 a 22 mm de largo por 17 a 19 de ancho, y llevan una bráctea dorsal de 4 a 5 mm, irregular-oval, de color castaño brillante, con el borde eroso, gruesamente laciniado.

La **semilla** es pequeña, elíptica, subangulosa, atenuada en la base, de color pardo oscuro, con ala casi oval, de 15 a 17 mm de largo incluyendo la semilla, por 3.5 de ancho, de color amarillento, a veces levemente rosado, provista de ganchos que sujetan a la semilla.

La **madera** es dura, blanquizca, algo resinosa.



Detalles morfológicos de *Picea chihuahuana* (Dibujo tomado de Martínez, 1953; imagen del cono:

## Anexo 2

### Información de Herbario de *Picea chihuahuana*



Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biología

[Colecciones Biológicas](#)



#### Información Taxonómica

Reino	Plantae
Phylum	Pinophyta
Clase	Pinopsida
Orden	Pinales
Familia	Pinaceae
Género	<i>Picea</i>
Epíteto específico	<i>chihuahuana</i>
Nombre Científico	<i>Picea chihuahuana</i> Martínez
Autor del nombre	Martínez
Estado del tipo	ISOTIPO



#### Información Curatorial

Código de la Institución	IBUNAM
Código de la Colección	MEXU
Número de catálogo	PVT2573
Colector	Maximino Martínez
No. de Colector	3401
Número de catálogo previo	2573
Notas	Categoría de riesgo_NOM: P = En peligro de extinción



#### Información Geográfica

Continente u Océano	América
País o Territorio	México
Estado o Provincia	Chihuahua
Municipio	Bocoyna
Localidad	Tucheachic

@irekani:imagenes@



Forma de citar esta página  
Instituto de Biología. "*Picea chihuahuana* Martínez - IBUNAM:MEXU:PVT2573".  
UNIBIO: Colecciones Biológicas. .  
Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2011-7-19.  
Disponibile en: <<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVT2573>>

## Anexo 3

Jueves 30 de diciembre de 2010

DIARIO OFICIAL

(Segunda Sección)

### SEGUNDA SECCION SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

**NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Familia	Género	Especie	Nombre común	Distribución	Categoría
Pinaceae	<i>Picea</i>	<i>chihuahuana</i>	Pinabete espinoso	No endémica	P

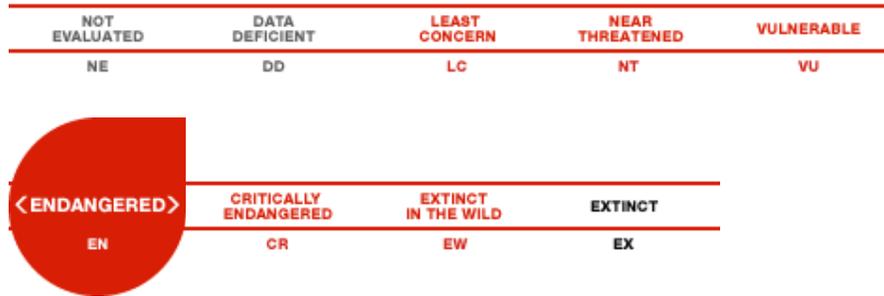
#### 2.2 Categorías de riesgo

##### 2.2.2 En peligro de extinción (P)

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010)

Anexo 4

*Picea chihuahuana*



**Taxonomy**

<b>Kingdom</b> PLANTAE	<b>Phylum</b> TRACHEOPHYTA	<b>Class</b> CONIFEROPSIDA	<b>Order</b> CONIFERALES	<b>Family</b> PINACEAE
---------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-----------------------------	---------------------------

**Scientific Name:** *Picea chihuahuana*  
**Species Authority:** Martínez

**Assessment Information**

**Red List Category & Criteria:** Endangered B1+2e [ver 2.3](#)  
**Year Assessed:** 1998  
**Annotations:** Needs updating  
**Assessor/s:** Conifer Specialist Group  
**History:** 1997 – Vulnerable (Walter and Gillett 1998)

**Geographic Range**

**Countries:** Native:  
Mexico (Chihuahua, Durango, Nuevo León)

**Population**

**Population:** A species known from about 25 sites, containing a few to several hundred trees.

**Habitat and Ecology**

**Habitat and Ecology:** In canyons or on moist north-facing scree slopes.  
**Systems:** Terrestrial

**Threats**

**Major Threat(s):** Regeneration is poor and inadequate. A continued decline in the population, especially of seeding trees, is expected.

**Citation:** Conifer Specialist Group 1998. *Picea chihuahuana*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 19 July 2011.

**Disclaimer:** To make use of this information, please check the <[Terms of Use](#)>.

**Feedback:** If you see any errors or have any questions or suggestions on what is shown on this page, please fill in the feedback form so that we can correct or extend the information provided

© International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.



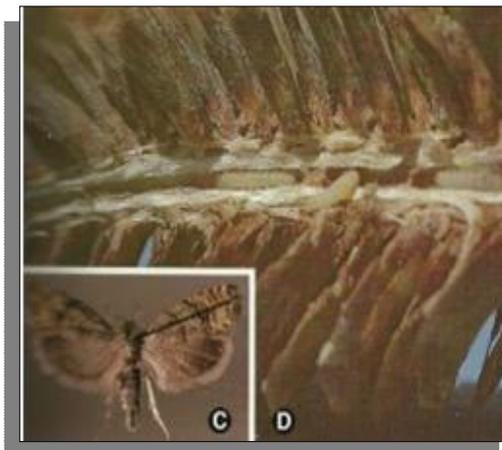
<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32479/0>

## Anexo 5

### *Cydia phyllisi* Miller (SARH, 1993)

**Hospedero:** *Picea chihuahuana*

**Descripción:** Los adultos son palomillas pequeñas de 10–12 mm de expansión alar; la cabeza y el cuerpo son gris cafésoso muy oscuro; las alas anteriores presentan el tercio basal de color gris; un poco más oscuro que el resto del ala, con escamas poco brillantes; los 2/3 distales con áreas transversales de color gris plateado y otras café oscuro que se van alternando; en las áreas plateadas se encuentran algunas líneas transversales incompletas de color café oscuro, que alcanzan el borde anterior del ala; las alas posteriores son café grisáceo muy oscuro. Las larvas son blancas y delgadas.



Adulto de *Cydia phyllisi* Miller y larvas en un cono de *P. chihuahuana*.  
(<http://insectosdeimportanciaforestal.blogspot.com/2010/10/insectos-de-conos-y-semillas.html>)

**Daño:** Las larvas se alimentan en las semillas de los conos de la misma forma que otras especies de *Cydia*, también hacen sus galerías para pupar en el eje del cono.

**Ciclo de vida y hábitos:** Los adultos emergen durante los meses de abril y mayo, cuando los conos inician su desarrollo, y ovipositan sobre las escamas; las larvas se alimentan de las semillas; para el mes de octubre todas las larvas están en el interior del eje del cono. Las pupas se presentan en abril.

**Importancia:** *Picea chihuahuana* es una especie que está en áreas muy reducidas de Chihuahua y Durango; actualmente no tiene importancia comercial; por ser una especie relicto y ornamental, puede ser más utilizada en el futuro. En los conos se han encontrado infestaciones severas por esta especie de *Cydia*, estimándose mortalidades de semilla superiores al 95%, principalmente en el Estado de Chihuahua. Se considera que esta plaga limita que se establezca la regeneración natural de su hospedero.

**Anexo 6**1. Medio B5 modificado por Litz (Chávez *et al.*, 1992 a, b y c).

<b>CONSTITUYENTE</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
<b>Macronutrientos</b>	
KNO <sub>3</sub> ·	2,500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	150
<b>Micronutrientos</b>	0.83
<b>KI</b>	6.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	22.3
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8.6
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	
<b>Fe-EDTA</b>	37.3
Na <sub>2</sub> EDTA	27.8
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	
<b>Compuestos orgánicos</b>	
<b>Vitaminas</b>	0.50
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.10
Tiamina-HCl	100
<b>Inositol</b>	2
<b>Aminoácidos</b>	
<b>Glicina</b>	400
Se agregan directamente al medio:	100
L- glutamina	100
L-arginina	
L-asparagina	
Ácido ascórbico	100
Hidrolizado de caseína	100
Sacarosa	60 gL <sup>-1</sup>
pH	5.7-5.8
Agar bacteriológico (Bioxon)	9 gL <sup>-1</sup>

2. Medio Schenk y Hildebrandt (SH), 1972 (modificado por Reilly y Washer, 1977).

CONSTITUYENTE	mgL <sup>-1</sup>
<b>Macronutrientos</b>	2, 500
KNO <sub>3</sub>	400
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	300
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	
<b>Micronutrientos</b>	1
<b>KI</b>	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.2
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.2
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	
<b>Fe-EDTA</b>	20
Na <sub>2</sub> EDTA	15
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	
<b>Compuestos orgánicos.</b>	
	5
<b>Vitaminas</b>	0.50
Ácido nicotínico	5
Piridoxina-HCl	
Tiamina-HCl	50
Inositol	
Sacarosa	30 gL <sup>-1</sup>
pH	5.7-5.8
Agar-agar (Merck®)	5.5 gL <sup>-1</sup>

## 3. Medio Murashige y Skoog (MS), 1962.

CONSTITUYENTE	mgL <sup>-1</sup>
<b>Macronutrientos</b>	1, 650
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1, 900
KNO <sub>3</sub>	370
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	170
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	440
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	
<b>Micronutrientos</b>	0.83
<b>KI</b>	6.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	22.3
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8.6
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	
<b>Fe-EDTA</b>	37.3
Na <sub>2</sub> EDTA	27.8
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	
<b>Compuestos orgánicos.</b>	
<b>Vitaminas</b>	0.50
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.10
Tiamina-HCl	100
Inositol	2
Aminoácidos	
<b>Glicina</b>	
Sacarosa	30 gL <sup>-1</sup>
pH	5.7-5.8
Agar-agar (Merck®)	5.5 gL <sup>-1</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE O, G. HUI, K. von GADOW y J. JIMÉNEZ. 2003. An analysis of spatial forest structure using neighbourhood-based variables. *Forest Ecology and Management* 183: 137–145.
- ATTREE S.M., D.I. DUNSTAN y L.C. FOWKE. 1991. White spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) and Black spruce (*Picea mariana* (Mill) B.S.P.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry . Vol. 16 Trees III. Y.P.S. Bajaj (Ed.). pp. 423-445. Springer-Verlag, Berlin Heilderbeg.
- BERLYN G.P., S.J. KOHLS y A.O. ANORUO. 1991. Caribbean Pine (*Pinus caribaea* Morelet). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 254-268.
- BONGA J.M. y P. von ADERKAS. 1992. *In vitro* cultures of trees. Forestry Sciences , Vol. 38. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 236 p.
- BORATYŃSKA K. 2007. Geographic distribution. En: Tjoelker M., A. Boratyński y W. Bugata (Eds.). Biology and Ecology of Norway Spruce. Forestry Sciences. Vol. 78. SpringerLink. pp. 23-36.
- BOSQUE MODELO CHIHUAHUA. 1995. SOS Especies en Peligro: Protección de la *Picea chihuahuana*. Folleto informativo *Voces del Bosque*. Año 1, No. 1. Mayo 1995. Chihuahua, México.
- BYE R. 1995. Prominence of the Sierra Madre occidental in the biological diversity of México. En: Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago. General Technical Report RM-GTR-264. September 19-23, 1994. Tucson, Arizona. Pp. 19-27.
- BYE R. 1997. A range full of treasures. *Ocelotl* Revista Mexicana de la Conservación. PRONATURA 6: 18-23.
- CAIRNS A.M., R. DIRZO y F. ZADROGA. 1995. Forest of México. A diminishing resource? *Journal of Forestry* 93(7): 21-24.
- CARO L., P. MARINANGELI, N.R.CURVETTO y L. HERNÁNDEZ. 2000. *Agrobacterium rizhogenes* vs inducción auxínica para la rizogénesis *in vitro* de *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz. *Multequina* 9: 47-53.
- CARRIER D.J., J.E. CUNNINGHAN, D.C. TAYLOR y D.I. DUNSTAN. 1997. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16: 550-554.
- CHAPARRO C. 1992. Factibilidad de la propagación *in vitro* de *Picea chihuahuana*. Tesis Ingeniero Agrónomo Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Delicias, Chihuahua. 99 p.

- CHÁVEZ V.M., R.E. LITZ, P.A. MOON y D.K. NORSTOG. 1992a. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 28: 59-63.
- CHÁVEZ V.M., R.E. LITZ, y D.K. NORSTOG. 1992b. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 93-98.
- CHÁVEZ V.M., R.E. LITZ, y D.K. NORSTOG. 1992c. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 99-105.
- CHEAH K.T. y T.Y. CHENG. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas Fir Cotyledon. *American Journal of Botany* 65(8): 845-849.
- CHESICK E.E. y B.A. BERGMANN. 1991. Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.) En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 241-253.
- CONABIO-CONANP (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2009. Pinabete de Nuevo León (*Picea martinezii*). Fichas de especies mexicanas., México, D.F. Compilado por Elizabeth Torres Bahena. Revisado por Carlos Galindo Leal. Página en red: [http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies\\_priori/fichas/pdf/PinabeteNuevoLeon.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_priori/fichas/pdf/PinabeteNuevoLeon.pdf) (Fecha de consulta: julio de 2011).
- CONIFER SPECIALIST GROUP. 1998. *Picea chihuahuana*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1 <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. (Fecha de consulta: julio de 2011).
- ELLIS D.D. y D.E. BILDERBACK. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *American Journal of Botany* 76(3): 348-355.
- ELLIS D.D. y D.E. BILDERBACK. 1991. Ponderosa Pine (*Pinus ponderosa* Laws.). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 339-357.
- FARJON, A. 2001. World checklist and bibliography of conifers. 2nd. Edition. Kew: Royal Botanic Gardens. 309 p.
- FLINN B.S., D.T. WEBB, y W. NEWCOMB. 1988. The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 66: 1556-1565.

- FORO DE BOSQUES MODELOS. 1996. Reunión de la Red Internacional de los Bosques Modelos. La Red en Acción. Chihuahua, México. 23-30 de octubre de 1996. Documento en red: *idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/14066/43/105230.pdf* (Fecha de consulta: abril de 2011).
- GALINDO F., G.L. 2004. Inducción de brotes adventicios *in vitro* y micorrización en condiciones de vivero de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 181 p.
- GALINDO-FLORES G., V.M. CHÁVEZ ÁVILA y A. ESTRADA TORRES. 1996. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. vía organogénesis a partir de embriones maduros. Resúmenes del III Congreso Nacional de Biotecnología. 14-18 de octubre. UACH-ANABAF. Chihuahua, Chih.
- GARCÍA C., F.T.A. 2003. Ontogenia de brotes adventicios obtenidos mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 89 p.
- GARCÍA-ARÉVALO A. 2008. Vegetación y flora de un bosque relictual de *Picea chihuahuana* Martínez del Norte de México. *Polibotánica* 25:45-68.
- GARCÍA-FERRIZ L., L. SERRANO y J.A. PARDOS. 1994. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 135-140.
- GARIN E., N. ISABEL y A. PLOURDE. 1998. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Reports* 18:37-43.
- GEORGE E.F. y P.D. SHERRINGTON. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics, Limited. Great Britain. 690 p.
- GEORGE E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics, Limited. Great Britain. 550 p.
- GEORGE E.F., M.A. HALL y G-J DE KLERK. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 501 p.
- GORDON A.G. 1968. Ecology of *Picea chihuahuana* Martínez. *Ecology* 49(5): 880-896.
- GUPTA P.K. y D.J. DURZAN. 1991. Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 383-407.

- GUPTA P.K., G. Pullman, R. Timmins, M. Kreitinger, W.C. Carlson, J. Grob y E. Welty. 1993. Forestry in the 21st Century. *BioTechnology* 11:454-459.
- HAKMAN I. y L.C. FOWKE. 1987. An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (White spruce). *Plant Cell Reports* 6: 20-22.
- HARRY I.S. y T.A. THORPE. 1991. Engelmann Spruce (*Picea engelmannii* Parry ex. Engelm.) En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 408-422.
- HARRY I.S. y T.A. THORPE. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37:159-164.
- IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 2011. Conifer Specialist Group 1998. *Picea chihuahuana*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. (19 de julio 2011).
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2011. Control mecánico de *Cydia phyllisi* Miller, gusano de la semilla de *Picea chihuahuana* Martínez. Fichas Tecnológicas Sistema Producto. Página en red: [http://www.utep.inifap.gob.mx/tecnologias/11\\_Agrícolas/Control\\_mecánico\\_de\\_Cydia\\_phyllisiMiller\\_gusano\\_de\\_la\\_semilla\\_de\\_Picea\\_chihuahuanaMartínez.pdf](http://www.utep.inifap.gob.mx/tecnologias/11_Agrícolas/Control_mecánico_de_Cydia_phyllisiMiller_gusano_de_la_semilla_de_Picea_chihuahuanaMartínez.pdf) (Fecha de consulta: Marzo de 2011).
- JACKSON S.T. y CH. WENG. 1999. Late quaternary extinction of a tree species in eastern North America. *Ecology* 96(24): 13847-13852.
- JACOB C, V. 1994. Estudio isoenzimático de la variación genética en poblaciones naturales de *Picea chihuahuana*, en los estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala, UNAM. México, D.F. 114 p.
- JANSSON E. y C.H. BORNMAN. 1981. *In vitro* initiation of adventitious structures in relation to the abscission zone in needle explants of *Picea abies*: anatomical considerations. *Physiologia Plantarum* 53:191-197.
- JENSEN W.A. 1962. Botanical Histochemistry-Principles and Practice. WH Freeman and Co. San Francisco and London.
- JOHANSEN D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book. Co. Inc., New York.
- KIRBY E.G. y M.E. SCHALK. 1982. Surface structural analysis of cultured cotyledons of Douglas-fir. *Canadian Journal of Botany* 60: 2729-2733.
- KRASOWSKI M.J. Y J.N. OWENS. 1993. Ultrastructural and histochemical postfertilization megagametophyte and zygotic embryo development of white

- spruce (*Picea glauca*) emphasizing the deposition of seed storage products. *Canadian Journal of Botany* 71: 98-112.
- LEDIG F.T., M. MÁPULA-LARRETA, B. BERMEJO-VELÁZQUEZ, V. REYES-HERNÁNDEZ, C. FLORES-LÓPEZ y M. A. CAPÓ-ARTEAGA. 2000. Locations of endangered spruce populations in México and the demography of *Picea chihuahuana*. *Madroño* 47(2): 71-88.
- LEDIG F.T., P.D. HODGSKISS, K.V. KRUTOVSKII, D.B. NEALE y T. EGUILUZ-PIEDRA. 2004. Relationships among the Spruces (*Picea*, Pinaceae) of Southwestern North America. *Systematic Botany* 29(2): 275-295.
- LEDIG F.T., V. JACOB-CERVANTES, P. HODGSKISS y T. EGUILUZ-PIEDRA. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution* 51(6):1815-1827.
- LESNEY M.S. 1991. Slash Pine (*Pinus elliottii* Engelm.) ) En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 288-303.
- LÓPEZ C., M.L., MÁRQUEZ, G. J. Y MURGUÍA, S.G. 1998. Técnicas para el estudio de la Biología Reproductiva en Angiospermas. Depto. de Biología, Lab. de Citología Vegetal. Facultad de Ciencias, UNAM. Las Prensas de Ciencias. 116 p.
- 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. Tesis Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 130 p.
- LÓPEZ-ESCAMILLA A.L., L.P. OLGUÍN-SANTOS, J. MÁRQUEZ, V.M. CHÁVEZ Y R. BYE. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, and endangered Mexican spruce tree. *Annals of Botany* 86: 921-927.
- MARTÍNEZ, M. 1942. *Picea chihuahuana*. *Anales del Instituto de Biología México* 13: 31.
- MARTÍNEZ, M. 1948. *Picea chihuahuana*. *Anales del Instituto de Biología México* 19(2): 393-405.
- MARTÍNEZ M. 1953. Las Pináceas Mexicanas. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Recursos y de Caza. México, D.F. p. 7-19.
- MATA R., M. 2000. Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras. Tesis Doctor en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 123 p.

- MATA R., M., V. M. CHÁVEZ ÁVILA y R. BYE BOETTLER. 2001. *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 37 (1): 73-78.
- MATHUR G. y R. NADGAUDA. 1999. *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks. *Plant Cell Reports* 19:74-80.
- MIYAZAWA K. y M.J. LECHOWICS. 2004. Comparative seedling ecology of eight North American spruce (*Picea*) species in relation to their geographic ranges. *Annals of Botany* 94: 635-644.
- MONTES R., G. 1993. Guía metodológica para cultivar *in vitro* *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii*. Instituto Tecnológico Forestal No. 1. SEP Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. El Salto, P. N., Durango. 32 p.
- MONTES R., G. y S. SOLÍS GONZÁLEZ. 1996. Efecto de la edad del explante para la inducción de organogénesis en *Pinus cembroides*. Resúmenes del III Congreso Nacional de Biotecnología. 14-18 de octubre. UACH-ANABAF. Chihuahua, Chih.
- MURASHIGE T. Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NANDWANI D., S. KUMARIA y P. TANDOM. 2001. Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). *Gartenbauwissenschaft* 66 (2): 68-71.
- ORTEGA C. 1997. Informe Final Fase 2: Comportamiento de varias procedencias de *Picea chihuahuana* Martínez en San Juanito, Chihuahua. INIFAP Centro de Investigación Norte-Centro. Campo Experimental Madera. 28 p.
- PATEL K.R. y G.P. BERLYN. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Canadian Journal of Botany* 61:575-585.
- PATTERSON T.F. 1988. A new species of *Picea* (Pinaceae) from Nuevo León, México. *SIDA* 13(2): 131-135.
- PHILLIPS G.C. y H.J. GLADFELTER. 1991. Eldarica Pine, Afghan Pine (*Pinus eldarica* Medw.). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 269-287.
- RANCILLAC M. 1991. Maritime Pine (*Pinus pinaster* Sol.). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 317-338.
- ROBLEDO P. A. 1987. Diferenciación de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski cultivados *in vitro*. Tesis Licenciatura (Bióloga) Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala. UNAM. México, D.F. 73 p.

- RUMARY C., K.R. PATEL y T.A. THORPE. 1986. Plantlet formation in black and white spruce. II. Histological analysis of adventitious shoot formation *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 64: 997-1002.
- RZEDOWSKI J. 1993. Bioversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F. pp. 129-145.
- SÁNCHEZ E., A.C. 2001. Comparación de la respuesta morfogénica *in vitro* de cuatro diferentes poblaciones de *Picea chihuahuana* Martínez, especie mexicana endémica en peligro de extinción. Tesis Licenciatura (Bióloga) Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 84 p.
- SÁNCHEZ G. y M. CANO. 1997. Conservación y aprovechamiento del Pinabete. Fase 1. Detección de áreas potenciales para la propagación de *Picea chihuahuana*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias. Campo Experimental Cd. Madera, Chihuahua. 26 p.
- SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1993. Manual Normativo de Sanidad Forestal. Tomo II. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre. Dirección General de Protección Forestal. Apoyos bibliográficos sobre plagas y enfermedades forestales. Anexo 3. Pp. 96-97.
- SARH-SSF. (Sin fecha). Folleto informativo "*Picea chihuahuana*, un árbol que se nos va". Subdelegación Forestal. Unidad de Conservación y Desarrollo Forestal No. 5. San Juanito-Creel, Chihuahua. México.
- SCHWARZ O.J., R.M. BEATY y E.O. FRANCO. 1991. Egg-Cone Pine (*Pinus oocarpa* Schiede). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 304-316.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 6 de marzo de 2002. México, D.F.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 30 de diciembre de 2010. México, D.F. p. 65.
- SCHENK R.U. y A.C. HILDEBRANDT. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.

- SCHOLTEN H.J. y R.L.M. PIERIK. 1998. Agar as gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports* 17: 230-235.
- STOJIČIĆ D., S. BUDIMIR y L. CULAFIC. 1999. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant Cell, Tissue and organ Culture* 59: 147-150.
- STYLES B. 1993. El género *Pinus*: su panorama en México. En: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). *Diversidad Biológica en México: Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F. pp. 397-420.
- TANG W., F. OUYANG y Z-C GUO. 1998. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. *Plant Cell Reports* 17: 557-560.
- TAYLOR R.J. y T.F. PATTERSON. 1980. Biosystematics of Mexican spruce species and populations. *Taxon* 29(4): 421-469.
- TAYLOR R.J., T.F. PATTERSON y R.J. HARROD. 1994. Systematics of Mexican Spruce- Revisited. *Systematic Botany* 19(1): 47-59.
- THOMAS P. y K. TRIPP. 1998. *Ex situ* conservation of conifers: A collaborative model for biodiversity preservation. *Public Garden The Journal of the American Association of Botanical Gardens* 13 (3): 5-8.
- THORPE T.A. y I.S. HARRY. 1991. Clonal propagation on conifers. *Plant Tissue Culture Manual*. C3:1-16. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands.
- THORPE T.A. y P.P. KUMAR. 1993. Cellular control of morphogenesis. En: M.R. Ahuja (ed.) *Micropropagation of woody plants*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 11-29.
- VILLALOBOS A., V. 1985. Las bases morfogénicas en la micropropagación de especies perennes. En: M. Robert y V.M. Loyola (Comp.). *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACyT. México, D.F. pp. 55-64.
- VILLALOBOS A. y E. PÉREZ MOLPHE BALCH. 1996. Desarrollo de sistemas para la organogénesis *in vitro* de cuatro especies mexicanas de pinos. Resúmenes del III Congreso Nacional de Biotecnología. 14-18 de octubre. UACH-ANABAF. Chihuahua, Chih.
- VILLALOBOS V.M. 1983. The early events associated with organogenesis in cultured radiata pine cotyledons. Thesis Doctor of Philosophy. Department of Biología. University of Calgary. Alberta, Canadá. 154 p.
- VILLALOBOS V.M., E.C. YEUNG y T.A. THORPE. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 63:2172-2176.

- VILLALOBOS V.M., M.J. OLIVER, E.C. YEUNG y T.A. THORPE. 1984. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 61: 483-489.
- von ARNOLD S. y T. ERIKSSON. 1985. Initial Stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Physiology Plantarum* 64:41-47.
- von ARNOLD S. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. *Newsletter (IAPTC)* 56: 2-13.
- von ARNOLD S. y I. HAKMAN. 1988. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *Journal of Plant Physiology* 132: 164-169.
- von ARNOLD S. y T. ERIKSSON. 1979. Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grow *in vitro*. *Plant Science Letters* 15: 363-372.
- von ARNOLD, S., AND T. ERIKSSON. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany* 59: 870-874.
- VOOKOVÁ B. y A. KORMUŤÁK. 2003. Plantlet Regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* x *Abies nordmanniana* Hybrid via Somatic Embryogenesis. *Turkish Journal of Botany* 27: 71-76.
- WAGLEY L.M., H.J. GLADFELTER y G.C. PHILLIPS. 1987. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. II. Macro- and micro-photographic evidence of *de novo* regeneration. *Plant Cell Reports* 6: 167-171.
- WANN S.R., M.A. JOHNSON, T.L. NOLAND y J.A. CARLSON. 1987. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L) Karst. *Plant Cell Reports* 6: 39-42.
- WEBB D.T. y B.S. FLINN. 1991. Eastern White Pine (*Pinus strobus* L.) En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 16 Trees III, Sección II. Gymnosperm Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 358-382.
- WEHENKEL C., J.J. CORRAL-RIVAS, R. SOLÍS-MORENO y J.C. HERNÁNDEZ. 2011. Is there a relationship between climate factor and genetic structure in *Picea chihuahuana* Martínez?. En: Libro de Resúmenes de Managed Forests in Future Landscapes. Implications for water and carbon cycles. International Year of Forests 2011. Santiago de Compostela, Spain. May 8-11, 2011. p. 141.
- WILLIAMS E.G. y G. MAHESWARAN. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.

