

97
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"MICROPROPAGACION DE Piqueria trinervia Cav.,
Y SU SOBREVIVENCIA EN SUELOS DERIVADOS DE
CENIZAS VOLCANICAS DEL ATUSCO, MEXICO EN
CONDICIONES DE INVERNADERO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JUANA MABEL HERNANDEZ ALTAMIRANO



MEXICO, D. F.



1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "MICROPROPAGACION DE Piqueria trinervia Cav., Y SU SOBREVIVENCIA EN SUELOS DERIVADOS DE CINIZAS VOLCÁNICAS DEL AJUSCO, MEXICO EN CONDICIONES DE INVERNADERO".
realizado por

Juana Mabel Hernández Altamirano
con número de cuenta 8637706-7, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Abraham Rubluo Islas

Propietario M. en C. Nicolás Aguilera Herrera

Propietario Dr. Manuel Jiménez Estrada

Suplente Biól. Enrique Ortiz Bermúdez

Suplente Biól. Claudia Vallejo Albarrán

Consejo Departamental de Biología

SECRETARÍA DE BIOLÓGICA

ESTA INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ
EN EL LABORATORIO DE CULTIVO
DE TEJIDOS VEGETALES DEL
JARDÍN BOTÁNICO INSTITUTO DE
BIOLOGÍA, BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. ABRAHAM RUBLUO Y EN
EL LABORATORIO DE
INVESTIGACIÓN DE EDAFOLOGÍA
CON LA ASESORÍA DEL M. EN C.
NICOLÁS AGUILERA HERRERA.

DEDICATORIA

A mis padres:

Sofía y Octavio, por su amor, confianza y el apoyo siempre incondicional que me han brindado.

A Bruno Unna

Por tu cariño, disposición y estímulo para hacer siempre mejor las cosas. Por formar parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Abraham Rubluo Islas por su asesoría para llevar a cabo esta investigación.

Al M. en C. Nicolás Aguilera Herrera por su constante enseñanza y compromiso con sus estudiantes. Al Dr. Manuel Jiménez, Biól. Enrique Ortiz Bermúdez y a la Biól. Claudia Vallejo Albarrán, por la acertada revisión y sugerencias para mejorar el manuscrito.

A mi maestra y amiga Isabel Saad.

A mis amigas Liza Covantes y Tere Marín, este trabajo fue muy agradable en su compañía.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y del Laboratorio de Investigación de Edafología, siempre es grato saber que hay disposición para enseñar a los demás.

A Fundación UNAM, por el apoyo otorgado para la realización de la presente investigación.

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	3
Resumen	4
Introducción.....	6
Justificación.....	7
Antecedentes.....	8
Ubicación taxonómica de <u>Piqueria trinervia</u> Cav.....	8
Características de <u>Piqueria trinervia</u> Cav.....	8
Nombres comunes	9
Localización	9
Importancia fitoquímica	9
El cultivo de tejidos vegetales como opción biotecnológica.....	11
Relación planta-suelo.....	19
Características de la zona de estudio.....	21
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	23
Materiales y método	24
Material biológico.....	25

Suelo.....	25
Estudios <u>in vitro</u>	27
Transplante a condiciones <u>ex vitro</u>	30
Resultados y discusión.....	32
Germinación.....	32
Cultivo <u>in vitro</u>	37
Enraizamiento.....	43
Aclimatización.....	46
Características de suelos derivados de cenizas volcánicas del Ajusco.....	48
Conclusiones.....	58
Apéndice I.....	61
Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).	61
Bibliografía.....	62

Abreviaturas

AIA	ácido 3-indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
2,4-D	2,4 diclorofenoxiacético
K	kinetina 6-furfurilaminopurina
MS	medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
CTV	cultivo de tejidos vegetales

Resumen

El Cultivo de Tejidos Vegetales es uno de los instrumentos de la Biotecnología Vegetal, a través del cual es posible obtener un incremento en el número de individuos a partir de un explante en condiciones asépticas, medios nutritivos, luz y temperatura controladas.

Esta técnica permite el conocimiento, aprovechamiento y conservación de las especies vegetales; gran cantidad de plantas ornamentales, medicinales y alimenticias se han propagado de esta manera.

En este trabajo se presenta la micropropagación de la especie *Piqueria trinervia* Cav, planta perteneciente a la familia Asteraceae (Compositae) y con importancia etnobotánica y fitoquímica por los compuestos que se le han extraído y que presentan actividad alelopática y moluscicida, aunque el espectro de acción de los compuestos extraídos sigue en investigación.

Para la propagación de esta especie se establecieron las condiciones óptimas de germinación en medio con agar al 1.6% en condiciones de luz/obscuridad, temperaturas de 17, 22 y 25°C y tiempos de estratificación a baja temperatura (4°C) .

La selección de los explantes fue a partir de secciones de tallo con hojas y tallo respectivamente, provenientes de plántulas germinadas *in vitro*. Un tercer explante se disectó de los brotes generados *in vitro* a partir del explante de tallo con hojas en medio MS con 1.0 mg/l de kinetina.

Para la inducción de brotación múltiple se utilizó como medio basal medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de kinetina en medio sólido, cuantificando la respuesta tanto por peso seco como por peso fresco. El tratamiento de medio MS adicionado con 2.0 mg/l de kinetina dió la mejor respuesta.

El enraizamiento se probó con las auxinas AIA, ANA e IBA en concentraciones de 0.5 mg/l, teniendo el mejor efecto el IBA, con el que se probaron concentraciones de 0.25 y 0.1 mg/l. Los sustratos utilizados fueron agar y vermiculita, no habiendo diferencia en la respuesta. Después de 17 días de enraizamiento las plantas se transplantaron a suelo, previamente analizado, para igualar las condiciones físicas y químicas de fertilidad de uno de los suelos donde crece la planta naturalmente. Se colectaron tres pozos en el km. 12 de la carretera México-Ajusco. De cada uno de ellos se obtuvieron tres muestras cada 20 cm hasta una profundidad de 60 cm. El suelo de la colecta se conoce como Andosol, suelo derivado de cenizas volcánicas.

La aclimatización consistió en mantener las plantas en el suelo analizado, cubiertas con una bolsa de plástico y reduciendo gradualmente la humedad relativa a través de perforaciones en las bolsas, la sobrevivencia se cuantificó por la presencia o ausencia de la planta después de 10 semanas en condiciones de invernadero. Ésta fue de 87%.

Introducción

De la variedad de plantas existentes en la naturaleza, el hombre aprovecha sólo una mínima parte. Destacan por su uso las alimenticias, medicinales y forrajeras; sin embargo, de la mayoría de las plantas se desconoce el potencial de aprovechamiento.

Una alternativa al cultivo tradicional, que ha venido desarrollándose desde hace varias décadas y que permite el conocimiento y aprovechamiento de los recursos bióticos, es la biotecnología vegetal. En esta disciplina se emplean técnicas como el cultivo de tejidos vegetales para obtener plantas libres de virus, o para la micropropagación de especies forestales y almacenamiento de germoplasma (Lozoya, 1985). Asimismo, se obtienen compuestos como terpenoides, alcaloides, fenoles, flavonoides y esteroides para la obtención de productos como medicamentos, insecticidas, colorantes y aromatizantes a través del cultivo de células (Crocomo *et al.*, 1981).

El beneficio de estas técnicas en cuanto a la obtención de metabolitos secundarios es, en algunos casos, el aumento en la producción de la sustancia de interés en comparación con lo obtenido por extracción tradicional. El aprovechamiento irracional de muchas especies podría llevar a la disminución de sus poblaciones y por consiguiente a la pérdida del recurso, por ello, se plantea la micropropagación de la planta *Piqueria trinervia* Cav., ya que es una especie con potencial por las sustancias fitoquímicas que se le han extraído y determinado y que presentan actividad alelopática y molusquicida ya comprobada.

Justificación

La creciente explotación de los recursos vegetales de nuestro país, ha generado también estudios para su conservación y posible aprovechamiento de manera interdisciplinaria.

Numerosas plantas están siendo estudiadas por las propiedades que se han encontrado en ellas; y de la mayoría se desconoce el potencial. Esto ha motivado el uso de nuevas metodologías dentro del CTV y su relación con otras disciplinas como la fitoquímica y la biología molecular, para el mejoramiento de las especies.

Muchas de las especies que están en peligro de extinción, amenazadas o presentan potencial, están siendo propagadas *in vitro*. Para ello se emplean compuestos que necesita, de manera natural e interna, la planta; así como condiciones ambientales que repercuten en su fisiología.

Debido a los problemas que se presentan durante el establecimiento de las plantas generadas *in vitro* a condiciones *in vivo*, se proponen una serie de estrategias basadas en investigaciones anteriores y en patrones de respuesta de algunos grupos de plantas que dan la pauta para la siguiente investigación.

Cabe señalar que la producción de los compuestos o metabolitos secundarios que producen algunas plantas que se han desarrollado por cultivo de tejidos, supera a las cantidades provenientes de las plantas de medios naturales. En el caso particular de la especie *Piqueria trinervia* Cav. la propagación *in vitro* es de importancia inmediata, pues el efecto descrito de sus compuestos está comprobado. De esta forma se puede proporcionar material vegetal y conservar las poblaciones silvestres, además de hacerlas aprovechables por rutas biotecnológicas.

Antecedentes

Ubicación taxonómica de Piqueria trinervia Cav.

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae (Compositae)
Tribu:	Eupatorieae
Subtribu:	Ageratinae
Género:	Piqueria
Especie:	<u>Piqueria trinervia</u> Cav.

Cronquist A, 1981 y King R. M. y Robinson H. 1987.

Características de Piqueria trinervia Cav.

Hierba anual o perenne, erguida, hasta de 70 cm de altura; tallo ramificado, cilíndrico, de 2 a 4 mm de diámetro, verde-amarillento y frecuentemente rojizo, glabro o puberulento solamente a lo largo de dos hileras longitudinales dísticas; hojas opuestas, peciolo de 2 a 3 mm de largo, casi glabro, lámina lanceolada o angostamente ovada, ápice agudo, borde aserrado, base cuneada, glabras, tri a pentanervadas desde la base; capítulos de 3 a 4 mm de largo, dispuestos en inflorescencias cimoso-corimbosas; brácteas involucrales 4, elípticas, anchas, de ápice redondeado y mucronado, erosomarginadas, verdes, glabras; flores 4; Corola de 1.5 mm de largo, tubo cortísimo, blanco con tinte rojizo, densamente pubescente, lóbulos blancos, glabros; aquenio de

aproximadamente 1.5 mm de largo, glabro, con 4 costillas, vilano ausente. Número cromosómico $2n=20, 22, 24$ (Rzedowski, 1985).

De acuerdo con Robinson (1906), el género Piqueria cuenta en total con unas 8 especies, de las cuales aproximadamente 7 con 2 variedades están presentes en México. Datos más recientes aportados por Rzedowski (1985), establecen que el género agrupa cerca de 20 especies distribuidas en América tropical.

Nombres comunes

Según el reporte de Martínez (1959), a Piqueria trinervia Cav., se le conoce comúnmente con los nombres de Hierba de San Nicolás, Xoloxiltic, Xoxonitzac, Xonitzal, Cuapopolchi en Gro. y Alta Reina en Taxco, Gro. Se le atribuyen propiedades contra la fiebre (antipirético) especialmente en casos de tifo, también contra los cálculos biliares y contra el reumatismo en infusión en alcohol.

González de la Parra et al., 1981, describen a P. trinervia Cav. como una planta utilizada y cultivada como ornamental y conocida erróneamente como Stevia serrata Cav.

Localización

Su distribución de acuerdo a McVaugh (1984), abarca la parte central de México, de Zacatecas y Tamaulipas a Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Morelos, D. F., Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí y Chiapas. Se localiza en bosques húmedos de pino o pino-encino.

Rzedowski (1985) reportó su colecta desde Huehuetoca a Talpan y Xochimilco, y de Pachuca a Amecameca, entre 2,300 y 3,000 m de altitud. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en México, Centro América y Haití.

Importancia fitoquímica

Piqueria trinervia Cav. ha sido frecuentemente investigada por los compuestos químicos que se le han extraído. En 1953 Paray reporta el uso de P. trinervia Cav.

como antipirético, antimalárico y antirreumático. Romo *et al.*, (1970) aislaron de tres colectas de la planta varios compuestos: el Acetato de Carquejilo y dos constituyentes que llamaron Piquerol A y Piquerol B, determinados como monoterpenos diastereoisómeros. Bolilman y Suwita (1978), obtuvieron un terpeno llamado H-NMR muy parecido a la estructura del Carquejol.

De acuerdo con Evenari (1949), algunos de los monoterpenos presentan actividad alelopática, esto motivó la investigación de González de la Parra *et al.*, (1981) quienes determinaron el potencial alelopático de *P. trinervia* Cav. utilizando Piquerol A y B, concluyeron que el extracto de las hojas presenta mayor contenido del compuesto y que éste a mayor concentración aumenta el efecto de alelopatía en todas las especies con las que se probó. Asimismo, comprobaron que con 50, 25 y 5 ppm de Piquerol en 8 especies de plantas, el Piquerol A inhibe la formación de raíces y el B inhibe el desarrollo de tallos más que de raíz, enfatizando la diferente actividad biológica entre compuestos estereoisómeros.

Jimenez y González de la Parra (1982), aislaron y determinaron la estructura de un nuevo alcohol diterpénico al que llamaron trinervinol. Posteriormente, Rubio *et al.*, (1985), dilucidaron la estructura electrónica del Piquerol A y B. Cruz-Reyes *et al.*, (1989), utilizaron el Piquerol en soluciones para comprobar la actividad del compuesto en diferentes especies de caracoles pulmonados vectores de algunos de los estadios de *Fasciola*. Con este trabajo y de acuerdo con la Guía de Evaluación para Molusquicidas de Origen Vegetal de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1983), el Piquerol A puede ser considerado como un molusquicida natural de uso práctico y potencialmente de uso a gran escala, ya que a concentraciones menores de 100 ppm mata al 90% de los caracoles utilizados.

Los primeros estudios de *Piqueria trinervia* Cav. en cultivo de tejidos se propusieron para investigar si es posible obtener el Piquerol en mayores concentraciones bajo este sistema, ya que de acuerdo con Rubluo *et al.*, (1995) se obtienen 9.5×10^{-5} mg/mg de

Piquerol por peso seco de hojas y tallos de la planta silvestre, lo que pondría en peligro a la especie si se extrajera el compuesto de las poblaciones silvestres.

El cultivo de tejidos vegetales como opción biotecnológica

La biotecnología vegetal se presenta como una alternativa para el estudio a nivel fisiológico, morfológico, fitoquímico y genético de especies vegetales potenciales. El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas es una de las ramas de la biotecnología de la que México y otros países del Tercer Mundo podrían obtener grandes beneficios a corto plazo (Robert y Loyola, 1985).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) aprovecha la propiedad de totipotencialidad de las plantas para que a partir de cualquier segmento de la planta se genere otra que puede ser genéticamente idéntica a la planta madre (George y Sherrington, 1984).

Estas técnicas se llevan a cabo en condiciones asépticas y en medios nutritivos que proporcionan a la planta los requerimientos esenciales para su crecimiento y desarrollo. Actualmente se cuenta con una serie de técnicas, tales como la clonación, cultivo de células haploides, la formación de embriones somáticos, el cultivo y fusión de protoplastos y la propagación de plásmidos para ingeniería genética cuya finalidad es que la investigación básica trascienda al área aplicativa (Sánchez, 1985).

La forma en que se ha aplicado todo este conocimiento es en la regeneración de plantas potencialmente útiles, propagación masiva de plantas alimenticias, recuperación de especies en peligro de extinción y preservación de germenoplasma *in vitro* (Rubluo, 1985), así como estudios para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Por ello, las plantas seleccionadas deben ser aquellas que sean difíciles de cultivar en el campo, que den rendimientos bajos, que hagan incosteable su cultivo o que no produzcan suficiente materia prima para las necesidades industriales (Robert y Loyola, 1985).

Para llevar a cabo la micropropagación de alguna especie, Murashige (1974) define el estado 0 y tres estados más que han sido adoptados por laboratorios de investigación y

laboratorios comerciales. Estos estados son: el estado 0 que corresponde a la selección y preparación de la planta madre, ésta generalmente es escogida como una planta típica de la variedad y libre de enfermedades, el estado 1 donde se lleva a cabo el establecimiento del cultivo en condiciones asépticas, estado 2 cuya finalidad es la producción de propágulos y el estado 3 donde las plantas desarrolladas in vitro se preparan para el crecimiento en el medio natural.

Explante

Una vez que se ha determinado la planta que se va a trabajar por medio de cultivo de tejidos, se selecciona el explante. Generalmente son tejidos jóvenes o poco diferenciados, aunque se tienen reportes del uso de raíces, anteras, polen, meristemos, hojas jóvenes o maduras según el tipo de respuesta que se busque.

En cuanto al tamaño del explante, los fragmentos grandes son fáciles de disectar y tienen mucho mayor sobrevivencia y desarrollo que los explantes menores a 0.5 cm (Evans et al., 1983).

Narayanuswamy (1977) analizó dos investigaciones de cultivo de tejidos y concluyó las siguientes consideraciones:

- que la superficie de cultivo del inóculo o explante es importante en la determinación del potencial de regeneración,
- que la edad fisiológica del explante es un factor importante y ejerce influencia en la formación de órganos, con ello se concluye que los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación que los tejidos viejos.

Cuando el explante proviene de plantas desarrolladas en ambientes externos, invariablemente estarán contaminados con bacterias y hongos (George y Sherrington, 1984). Por lo tanto, las plantas pueden estar libres de contaminantes y proveer explantes cuando provienen de semillas esterilizadas y sembradas en medios asépticos. Para ello, se requiere que las semillas o segmentos de la planta que sirven de inóculo,

sean lavadas con detergente y posteriormente colocadas en alcohol etílico al 70%; el efecto que causa el alcohol en la superficie es la eliminación de las grasas, permitiendo que el desinfectante penetre y elimine a los microorganismos. Los desinfectantes pueden ser hipoclorito de calcio o sodio, aunque también puede ser empleado el peróxido de hidrógeno, agua de bromo y nitrato de plata (Merino, 1985). Posteriormente el material es enjuagado con agua destilada esterilizada en condiciones asépticas y sembrado en los medios establecidos.

Condiciones de cultivo in vitro

La respuesta morfológica y fisiológica que presenta un tejido o explante, va a estar determinada por factores como el medio basal, el pH y los reguladores de crecimiento a los que está expuesto, así como factores físicos como el fotoperíodo, la intensidad de luz y la temperatura.

Medio basal

Según George y Sherrington (1984), un medio es una solución que contiene sales que suplen en mayor o menor grado los elementos necesarios para el desarrollo de las plantas; como son los micronutrientes y macronutrientes, vitaminas como la timina y piridoxina, aminoácidos y fuentes de carbono. La sacarosa es más comúnmente usada como fuente de carbono aunque ocasionalmente se emplea la glucosa, fructosa y almidón en algunas especies (Merino, 1987).

Los medios de cultivo pueden utilizarse en forma líquida o semisólida con la adición de algún gelificante como el agar, del cual se aprovecha la consistencia coloide para servir de soporte y proveer de nutrientes a la planta. Otros compuestos orgánicos que suelen agregarse al medio son antioxidantes como ácido cítrico y ascórbico. Generalmente los distintos medios de cultivos que se tienen registrados en la literatura difieren en la cantidad de sales, vitaminas y reguladores de crecimiento. La fórmula de Murashige y Skoog. 1962 (ver apéndice 1) se considera como el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de la planta. Esta fórmula contiene grandes concentraciones de macronutrientes así como nitrato de

amonio y nitrato de potasio (Merino, 1987). Estos dos últimos componentes están relacionados con la respuesta de organogénesis de los tejidos.

pH del medio

Aún cuando no se han hecho estudios acerca del efecto del pH óptimo para diferentes especies, generalmente la acidez de los medios de cultivo se ajusta entre 5.0 y 6.5 antes de la esterilización (Villalobos, 1985). Estos rangos, cuando no son correctamente calibrados, influyen en la solidificación del medio y en la disponibilidad de nutrientes ya que es conocido que algunos elementos suelen precipitarse o no estar disponibles para la planta a cierto pH.

Reguladores de crecimiento

Para inducir una respuesta en los tejidos cultivados *in vitro*, es necesaria la adición de compuestos orgánicos llamados reguladores de crecimiento. Este término se le confiere a los compuestos distintos de los nutrientes que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Barba, 1987).

Algunas clases conocidas de reguladores del crecimiento son auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (George y Sherrington, 1984). Los dos primeros compuestos se utilizan más en la micropropagación, ya que la actividad reconocida de las auxinas es la elongación celular y una menor actividad que comparte con las citocininas, es la inducción de la división celular. El balance que estos reguladores tengan en el medio influye en la respuesta morfogénica.

Estudios realizados por Murashige y Skoog (1962) reportan que a bajas concentraciones de auxina y altas de citocininas la respuesta es hacia la diferenciación de tejido organizado o también llamado cultivo de órganos, en tanto que a concentraciones altas de auxinas y bajas o nulas de citocininas el tejido se desdiferencia y da origen a una masa amorfa de células llamada callo, o bien,

formación de raíz. Estas respuestas pueden variar de acuerdo con la naturaleza del tejido o de la planta misma.

Factores físicos

La temperatura, fotoperiodo e intensidad de luz son diferentes para las especies, generalmente en los cuartos de incubación la temperatura promedio es de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, aunque se sabe que los pretratamientos con bajas temperaturas pueden influir en la morfogénesis *in vitro* (Villalobos, 1985) al igual que la intensidad de luz. En cuanto al fotoperiodo, este influye en la síntesis y la acumulación de almidón y en las hormonas endógenas, afectando el desarrollo del explante. Dependiendo de la especie, se puede requerir desde 12 horas diarias de luminosidad, hasta luz continua, y de 1,000 a 10,000 luxes de intensidad (Lozoya, 1985).

Micropropagación

La combinación de los factores anteriormente señalados genera respuestas en algunos casos bien conocidas. De acuerdo con George y Sherrington (1984), las diferentes respuestas que presentan las auxinas es la rizogénesis y embriogénesis, esta última comunmente iniciada con la auxina 2,4-D.

El cultivo de órganos o multiplicación de brotes, puede obtenerse de forma directa (organogénesis directa) cuando a partir del explante y por inducción de citocininas se forman brotes adventicios, o por vía indirecta (organogénesis indirecta) que se obtiene por la proliferación de callo a partir del explante y la posterior aparición de brotes.

La producción de embriones somáticos de células, tejidos u órganos puede ocurrir, al igual que la organogénesis, de forma directa o indirecta. El modo directo de la embriogénesis somática, involucra la formación de un embrión asexual de una sola célula o grupos de células en una parte del explante sin la intervención de la fase de callo. El modo indirecto de la embriogénesis, consiste en el establecimiento del explante en cultivo con la subsecuente proliferación de callo y la iniciación de proembriones en un medio que contenga altas concentraciones de auxinas (Dixon, 1991).

Micropropagación de especies de la familia Asteraceae (Compositae)

La propagación de especies pertenecientes a la familia Asteraceae o Compositae tiene, entre otras finalidades, el incremento masivo de especies de interés comercial, así como el uso de las técnicas de CTV para propagar especies silvestres y en muchos otros casos inducir la producción de compuestos químicos por estos métodos.

Algunas de las especies silvestres que se reportan en la literatura son *Achillea nobilis* y *A. ptarmica*; *Anthemis arvensis*; *Brachicome dichrosomatica*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *C. parthenium* y *C. segetum*; *Crepis capillaris*; *Hypochoeris radiculata*; *Leontodon autumnalis*; *Matricaria onodora*; *Matricularia maritima*; *Parthenium hysterophorus*; *Pteotheca falconeri*; *Senecio jacobaea*, *S. sylvaticus*, *S. vernalis*, *S. viscosus*, *S. vulgaris*; *Taraxacum officinale* y *Xanthium pennsylvanicum*. (George y Sherrington, 1984).

Las respuestas que se han obtenido mediante el CTV varían desde raíces hasta formación directa de brotes y embriones. Los beneficios que proporciona a la micropropagación en este caso, son la disponibilidad o producción de plantas todo el año así como material de alta calidad fitosanitaria (Lozoya, 1984).

En el caso de la extracción de compuestos químicos los métodos usados en CTV son el cultivo en suspensión o cultivo de células y su posterior extracción ya sea del medio de cultivo, en el caso de las células que excretan el producto, o bien directamente de las células. Los compuestos son metabolitos secundarios provenientes de una larga cadena de adaptaciones e interacciones entre el organismo y el medio (Thorpe, 1981).

Enraizamiento

Una vez que se han establecido las condiciones para la micropropagación, el enraizado es un procedimiento que puede llevarse a cabo in vitro o ex vitro al momento de la aclimatización.

En algunas especies se necesita transferir los brotes a un medio libre de hormonas para inducir la raíz, ya que ésta es frecuentemente inhibida por las citocininas usadas para

inducir brotación múltiple, así que los brotes no forman raíz hasta que son cultivados en un medio que contenga auxinas. (George y Sherrington, 1984). Las auxinas comúnmente incorporadas al medio para inducir la raíz son, AIA (0.1-10 mg/l), ANA (0.05-1 mg/l) e IBA (0.5-3.0 mg/l). Sin embargo, la respuesta de las auxinas puede variar, ya que algunas inducen mejor respuesta que otras.

Al incorporar el enraizador, algunos constituyentes del medio también son modificados, generalmente se recomienda que las sales se reduzcan a la mitad o menos del contenido inicial. Hyndman *et al.*, (1982) obtuvo raíces reduciendo particularmente la concentración de nitrógeno. Sin embargo, una vez que las plantas han desarrollado raíz, estas pueden dañarse al ser sacadas del medio y ser lavadas para quitar el agar. Debergh y Maene (1981), establecieron que las plantas que fueron transferidas a suelo y dos meses después analizadas, mostraron muerte de las raíces desarrolladas *in vitro* pero crecimiento de nuevas raíces.

Algunos sustratos utilizados para transferir las plantas cultivadas *in vitro* son perlita, vermiculita o suelo (George y Sherrington, 1984). Aldrufeu *et al.*, (1983) y Noiton, (1988) establecieron que las propiedades físicas del sustrato presentes durante la rizogénesis *in vitro* determinan la iniciación, desarrollo y número de raíces del explante. Offord *et al.*, (1992) proponen que el uso de sustratos porosos como arena permiten el desarrollo normal y del cual las raíces son fácilmente removidas o transferidas, pueden acelerar la aclimatación y también evita el daño a las raíces.

Aclimatización

El término aclimatización indica la transición de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo*. Comúnmente las palabras aclimatación y aclimatización se usan como sinónimos pero acorde con la connotación de horticultura, aclimatación denota el proceso durante el cual las plantas u otros organismos, comienzan a ajustarse a un nuevo clima o situación que resulta de un proceso natural, y la aclimatización implica que el hombre intercede y guía el proceso de ajuste (Debergh, 1991).

En el caso de las plantas que se desarrollan en condiciones in vitro y se establecen en invernadero, el proceso que asegura una mayor supervivencia de las plantas es la aclimatización. Este proceso es necesario por que las plantas no están adaptadas a las condiciones in vivo. Generalmente estas plantas presentan alteraciones en la anatomía de las hojas, ya que a diferencia de las que nacen y se desarrollan en invernadero presentan hojas delgadas y pequeñas, así como malformaciones en los cloroplastos debido a variación en la intensidad de luz (Lee et al., 1988).

Preece y Sutter (1991) y Shackel et al., (1990) descubrieron alteraciones en la estructura de la cutícula al igual que anomalías en los estomas, factores que intervienen en la capacidad de regulación de la pérdida de agua por la planta.

A nivel fisiológico, se han descrito trabajos que reportan la poca fijación de CO₂, factores que afectan la fotosíntesis como la intensidad de luz, así como mecanismos para estimular el autotrofismo de las plantas en el proceso de aclimatización (Debergli 1991; Preece y Sutter 1991; Grout y Aston 1977; Donnelly y Vidaver 1984; Kozai et al., 1987; Navarro et al., 1994 y SantaMaría y Davis, 1994).

La mayoría de las malformaciones o disfunciones de las plantas en condiciones in vitro se pierden al generar nuevas estructuras como hojas, cera epicuticular y estomas funcionales que garantizan su sobrevivencia durante el periodo de ajuste a las condiciones in vivo.

Una vez que se logra la aclimatización de las plantas, las rutas finales pueden ser los mercados de distribución o bien, en el caso de las plantas que están amenazadas o en peligro de extinción, reintroducirlas a su hábitat.

Aunque Piqueria trinervia Cav. no se encuentra en alguno de estos casos, su uso potencial como herbicida o molusquicida y la baja producción del metabolito por extracción tradicional, la hacen susceptible a ser sobreexplotada. Estas características, aunadas a que todo programa de aprovechamiento debe estar fundamentado en uno de conservación, permite el uso sostenible de los recursos.

El estudio interdisciplinario que se lleva a cabo para el futuro aprovechamiento de Piqueria trinervia Cav. establece también su conservación; para ello, la micropropagación y su establecimiento en suelos naturales permitirá mantener a las poblaciones presentes en sus hábitats.

El tipo de suelos que alberga a esta especie, entre muchos otros, pertenece al orden Andisol, el cual se describirá más adelante.

Relación planta-suelo

La relación que existe entre suelo y planta se atribuye al complejo sólido y dinámico de nutrientes, gases, agua y microorganismos que van a interactuar con las plantas y que van a influir finalmente en su fenotipo. Este sistema denominado suelo se encuentra bajo la influencia del clima y el medio biológico.

De acuerdo con Ortiz y Ortiz (1984), los suelos presentan variaciones que los caracterizan y que se deben a causas que involucran al material parental, la vegetación, el clima, la topografía y el tiempo.

Aunque la mayoría de los nutrientes esenciales y funcionales que necesitan las plantas se derivan del material parental, el clima afecta la cobertura de vegetación y por consiguiente la evolución del suelo. Los factores que regulan el clima y que van a influir en las características del suelo son la precipitación y la temperatura.

En el caso de los organismos que también se ven involucrados en el proceso de génesis del suelo, se encuentran protozoarios, microartrópodos, bacterias, hongos, algas, anélidos, así como animales de talla mayor como roedores.

Los aspectos anteriormente señalados se ejemplifican en el caso de suelos forestales. En ellos, el clima que comúnmente se presenta es templado a semifrío. Estas condiciones reducen la actividad de los microorganismos, de manera que se acumula mayor cantidad de material orgánico que en suelos de clima cálido o tropical, por la escasa degradación que realizan.

Cepeda (1985), menciona que la temperatura afecta la velocidad de las reacciones químicas e influye en la descomposición de la materia orgánica. De igual manera, los cambios de temperatura provocan el enfriamiento y calentamiento del material parental provocando su fraccionamiento y con ello el aporte de minerales que servirán de nutrientes a las plantas.

De acuerdo con Ortiz y Ortiz (1984), la vegetación forestal regresa menos sales alcalino-térreas y metales alcalinos a la superficie con vegetación cada año. Esta característica le da una naturaleza ácida al suelo, pues el agua que entra es más ácida en suelos forestales que en suelos de pradera. En los suelos forestales la acción microbiana la llevan a cabo los hongos principalmente. Asimismo los restos vegetales que contienen lignina y resinas que son de difícil degradación enzimática, se van acumulando y permanecen como material de reserva.

Con base en la información sobre la composición, las propiedades y las reacciones químicas que ocurren en el suelo, se pueden resolver problemas relacionados con su fertilidad y con la nutrición vegetal. Los resultados de los análisis químicos permiten clasificar a los suelos en sus distintos órdenes y sirven como base a la planificación del desarrollo agrícola, ganadero y forestal (Cepeda, 1985).

Uno de los suelos donde crece Piqueria trinervia Cav. pertenece a suelos Andosoles, derivados de cenizas volcánicas. Según datos de Ortiz (1987), el territorio nacional presenta un relieve accidentado por la presencia de los diferentes cadenas montañosas como la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur y Eje Neovolcánico Transversal, que mantienen al 4.3% de los suelos de este tipo, que son utilizados como tierras de cultivo y que sostienen una importante superficie boscosa.

De acuerdo con Hidalgo (1988) esta superficie abarca los bosques del Distrito Federal, México, Puebla, Tlaxcala, Morelos y Michoacán, lugares que a su vez presentan una alta densidad de población humana.

Aguilera (1965;1989), establece que en nuestro país, los suelos de Ando (Andosoles) están caracterizados tanto en zonas templadas como en zonas tropicales, asociándose a ellos una gran variedad de grupos de vegetación: bosque de pino, encino, oyamel, etc.

Características de la zona de estudio

El área de estudio corresponde a una sección del Cerro del Ajusco, ubicada dentro de la Delegación de Tlalpan en México D. F. y perteneciente a la Sierra de Chichinautzin donde se han localizado poblaciones de la planta Piqueria trinervia Cav.

Esta localidad se encuentra en el km. 12 de la carretera México-Ajusco, latitud 19°13' N y 99°18' de longitud Oeste. El clima de la región según García (1988) corresponde a un Cb(w₂)(w)_{ig}, semifrío o templado con verano fresco largo, con temperatura media anual de entre 12°C y 18°C, el mes más frío con temperaturas mínimas de -3°C y máxima de 18°C, el mes más caliente es reportado con temperaturas de entre 6.5°C y 22°C.

La precipitación registrada es de 700 a 1,500 mm anuales. La vegetación predominante corresponde a bosque de pino, por lo que su uso de acuerdo con la pendiente y tipo de suelo es forestal. La fauna está representada por conejos, tuzas, tejones, ratón, rata de campo, víbora de cascabel, así como numerosos insectos.

De acuerdo al reporte del CETENAL (1976), el suelo corresponde a un Andosol húmico de textura media. Su origen se deriva de roca ígnea extrusiva.

Según datos del ICOMAN (1988) estos suelos se desarrollan en ejectas volcánicas (tal como cenizas volcánicas, pumita, anders y lava) y/o material volcanoclástico.

Se reconocen como componentes de los Andosoles el "material amorfo" como alofano, imogolita y ferrihidrita y/o complejos de Al-humus (Parfitt *et al*, 1991).

Algunas de las propiedades de estos suelos son la baja densidad aparente, alta microporosidad con rápido drenaje y baja tensión, suelos sensitivos con baja

resistencia a disturbios mecánicos, erosión potencial por viento y agua, y retención moderada a alta de fosfatos y sulfatos.

La zona de colecta presenta alteraciones por la actividad humana como los asentamientos y los incendios provocados por pastores o visitantes.

Objetivos

Objetivo general

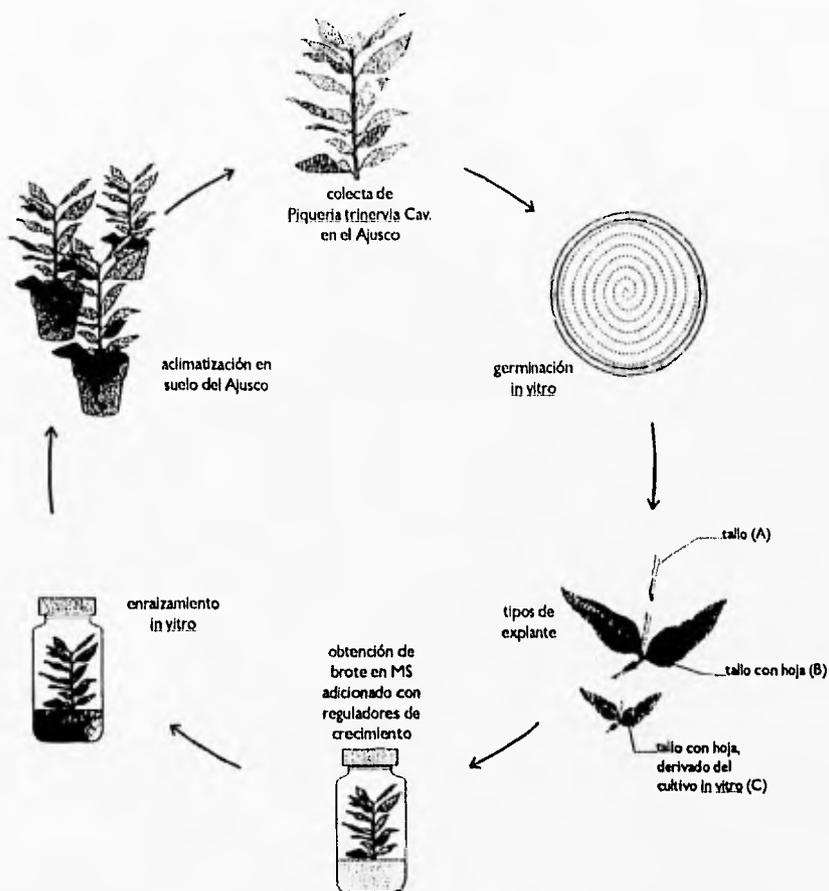
Utilizar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para inducir la micropropagación y la posterior aclimatización de Piqueria trinervia Cav., en suelos derivados de cenizas volcánicas, así como la determinación de fertilidad del suelo para valorar el desarrollo de la planta.

Objetivos particulares

- Determinar las condiciones óptimas de germinación de Piqueria trinervia Cav.
- Evaluar tanto explantes como concentraciones de reguladores de crecimiento necesarios para la obtención de brotación múltiple.
- Establecer el mejor sustrato, el tipo de auxina y la concentración para inducir la rizogénesis en los brotes.
- Evaluar la adaptación de los brotes aclimatizados en condiciones de invernadero y en suelos derivados de cenizas volcánicas.

Materiales y método

Estrategia general de micropropagación



Material biológico

Para la realización de la presente investigación se colectaron plantas de Piqueria trinervia Cav. en el Km. 12 de la carretera México-Ajusco, D. F. Dicha colecta se realizó en noviembre de 1993 y septiembre de 1994, época en que la planta presentó una inflorescencia avanzada y formación de semillas.

Para la obtención de semillas se secaron tallos que portaban la inflorescencia; una vez seca, se desprendieron las semillas por frotación y se guardaron en frascos tapados.

De acuerdo con Ortiz, (1995) dentro del fruto (aquenio) se encuentra una sola semilla con embrión recto. En el caso de los experimentos para cuantificar la germinación de Piqueria trinervia Cav. se sembró el aquenio que contenía la semilla, por lo que se decidió utilizar el término de "semilla" en todos los casos.

Suelo

Para el proceso de aclimatización de las plantas desarrolladas *in vitro*, se realizó una colecta de suelo en el lugar donde se obtuvo la planta, en el mes de noviembre de 1993. Se hicieron tres pozos y se tomaron muestras cada 20 cm, hasta una profundidad de 60 cm. Las muestras, de aproximadamente 2 kg, se colocaron en bolsas y se etiquetaron con los datos de campo.

Las muestras se secaron al aire y tamizaron con un tamiz del No. 10 (0.2 mm).

Los análisis físico y químico se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Edafología de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde se hicieron las siguientes determinaciones:

Análisis físico

- Color en seco y húmedo, por el método de Munsell (1975).
- Densidad aparente, por el método de la probeta (Baver, 1956).

- Densidad real por el método del picnómetro (Baver, 1956).
- Textura por el método del hidrómetro de Bouyoucos (1951).
- Determinación del porcentaje de porosidad.

Análisis químico

- Potencial de hidrógeno (pH), por el método del potenciómetro con agua destilada y solución salina (KCl 1 N, pH 7) en relación 1:2.5.
- Materia orgánica, por el método de Walkey y Black (1977), citado por Jackson, (1982).
- Capacidad de intercambio catiónico total, por el método de centrifugación, saturado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 N, pH 7), lavado con alcohol etílico al 96% y eluyendo con NaCl (1N, pH 7).
- La determinación volumétrica se realizó con Versenato (EDTA 0.02 N) y negro de ericromo "T" (Jackson, 1982).
- Calcio y magnesio intercambiables, por el método de extracción con acetato de amonio (1 N, pH 7) y valoración por el método del Versenato (EDTA 0.02 N) (Cheng y Bray, 1951).
- Sodio y potasio intercambiables, por el método de extracción con acetato de amonio (1 N, pH 7) y espectrofluorimetría (Jackson, 1982).
- Determinación de nitrógeno total, por el método de Kjeldahl, citado por Jackson, (1982).
- Determinación de alófono, por el método de Fielde y Perrot (1966).

Estudios *in vitro*

Medio básico

El medio de cultivo utilizado en la inducción de brote y enraizamiento fue el propuesto por Murashige-Skoog (1962) (Ver apéndice 1). Se ajustó el pH del medio a 5.7 con HCl y KOH 0.5 N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C.

Para los experimentos de germinación se empleó un medio que contenía únicamente agar bacteriológico 8 g/l, pH 5.7 ajustado con HCl y KOH 0.5 N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C.

Germinación

Para la siembra de semillas *in vitro* se procedió a desinfectarlas lavándolas con agua corriente y dos gotas de TWEEN 80, durante 5 min en agitación constante; se enjuagaron con agua corriente sobre una malla metálica y se colocaron en etanol al 70% durante 20 s. Se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.65% en agitación constante, durante 20 min. Finalmente, en condiciones asépticas, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, dentro de una campana de flujo laminar (VECO) y se sembraron en cajas de Petri.

Para determinar los factores que intervienen en la germinación de las semillas se diseñaron 3 experimentos:

1. Se probó la respuesta de germinación en condiciones de luz y oscuridad.
2. Tiempo de estratificación a baja temperatura (4°C) durante 4 y 6 meses.
3. Temperaturas de 17°, 20° y 25°C.

En todos los experimentos se utilizaron cajas de Petri con 25 ml de medio de germinación que contenían 30 semillas y se hicieron 4 repeticiones por tratamiento.

Los experimentos 2 y 3 se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo largo (16 hrs. luz, 8 hrs. oscuridad) a 25°C y con una intensidad luminosa de 1,600 lux durante la germinación.

La respuesta de germinación de las semillas se evaluó después de 21 días de haber sido sembradas. Se consideraron germinadas las semillas que presentaban hipocótilo emergido hacia el medio.

Obtención de brote

El material vegetal utilizado para la generación de brotes se obtuvo a partir de plantas germinadas *in vitro* de dos meses de edad. Se utilizaron como explantes : a) tallos con nudo de 0.5 a 1.0 cm de longitud, b) secciones de tallos de 2.0 cm con nudo y un par de hojas y c) secciones de tallos de 2.0 cm con nudo y un par de hojas obtenidos *in vitro*. Para determinar el regulador de crecimiento inductor de brotación, se diseñaron tres experimentos:

1. Un tratamiento preliminar con la combinación de dos citocininas (K y BAP) con dos auxinas (ANA y AIA) en diferentes concentraciones (ver tabla 1), utilizando como explante tallo con nudo.
2. Se utilizó la mejor respuesta del experimento anterior y se probó el efecto de tres concentraciones de kinetina, tratamientos M1(1 mg/l), M2 (2 mg/l) y M3 (3 mg/l).
3. Para determinar el tipo de explante se utilizó el tratamiento de la mejor respuesta del experimento anterior (M1) con los tres tipos de explantes antes mencionados.

En todos los casos se emplearon frascos de vidrio con capacidad de 100 ml que contenían 25 ml de medio con tres explantes cada uno. Se pusieron ocho repeticiones por tratamiento. Los frascos se mantuvieron en cámaras de incubación a 25°C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad luminosa de 1,600 lux. La respuesta se evaluó después de 30 días de tratamiento por cuantificación de brotes en los tres experimentos y en el segundo, además, por cuantificación de biomasa. Los

datos fueron analizadas estadísticamente por análisis de varianza seguida por la prueba de Tukey, con un nivel de significancia $p=0.05$

Tabla 1. Experimento preliminar para la inducción de brote a partir de explante de tallo de 0.5 a 1 cm en medio Murashige-Skoog (1962) adicionado con K, BAP, ANA y AIA. pH: 5.7, sacarosa: 30 g/l, 8 g/l de agar, $25\pm 2^\circ\text{C}$, 16 h luz, 1,600 lux.

aux ↓	cit →	K 1 mg/l	BAP 5 mg/l
ANA mg/l	0.0	1	9
	0.1	2	10
	0.5	3	11
	1.0	4	12
AIA mg/l	0.0	5	13
	0.1	6	14
	0.5	7	15
	1.0	8	16

Enraizamiento

Los brotes empleados en esta etapa permanecieron dos meses en el medio de inducción. Para el enraizamiento se hicieron tres experimentos:

1. Se probó la acción de las auxinas ANA, AIA e IBA sobre el enraizamiento en los siguientes tratamientos:
 - R1) MS más 0.5 mg/l de ANA
 - R2) MS más 0.5 mg/l de AIA
 - R3) MS más 0.5 mg/l de IBA
2. Se probó el regulador que dió la mejor respuesta pero en concentraciones de 0.5, 0.25 y 0.1 mg/l y en medio MS al 50% de sales.
3. Se evaluó el efecto del soporte en la formación de raíz, usando como substrato vermiculita y agar en medio MS al 50% de sales.

En los experimentos uno y dos se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 150 ml que contenían 25 ml de medio y un brote por frasco. En el tercer experimento se emplearon frascos de vidrio con capacidad para 500 ml a los cuales se les adicionaron

40 ml de medio MS líquido en aproximadamente 15 g de vermiculita y posteriormente fueron esterilizados, se colocó un brote por frasco en condiciones asépticas. Los brotes permanecieron en las condiciones antes descritas de iluminación y temperatura. La respuesta se evaluó después de 17 días de transplante por presencia o ausencia de raíz.

Transplante a condiciones ex vitro

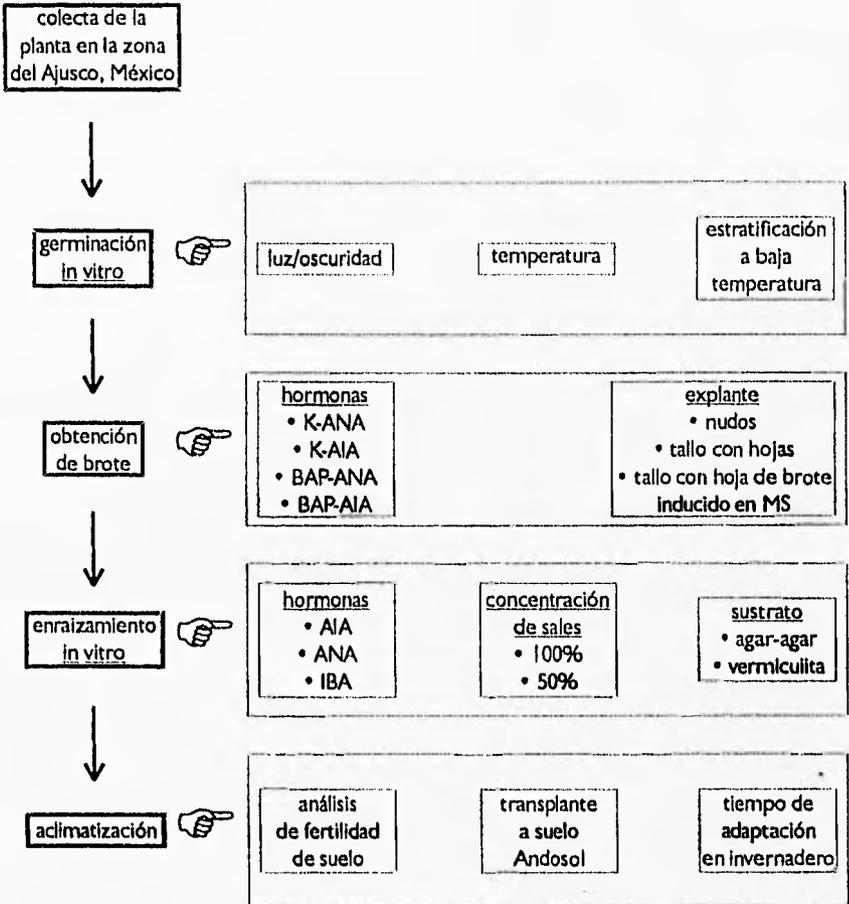
La aclimatización de las plantas desarrolladas in vitro se llevó a cabo en vasos de unisel que contenían el suelo colectado y colocados en condiciones de invernadero.

Las plantas se sacaron de los frascos que contenían vermiculita y se enjuagaron con agua corriente, se colocaron en una solución con fungicida (Agrinycin) al 2.0% durante 20 min y se plantaron en los vasos que contenían suelo no estéril. Los vasos fueron tapados con bolsas de plástico para mantener la humedad relativa alta y se llevaron al invernadero, en el cual, a los catorce días, se comenzó a perforar las bolsas para reducir la humedad relativa de manera gradual. Cinco semanas después las bolsas fueron retiradas y las plantas se transplantaron a macetas de cinco kilogramos. El riego se aplicó con agua corriente dos a tres veces por semana.

La evaluación de sobrevivencia se consideró con la cuantificación de las plantas hasta las 10 semanas de haber sido sacadas de las condiciones in vitro.

Micropropagación y aclimatización de *Piqueria trinervia* Cav.

Metodología general.



Resultados y discusión

Germinación

Para la micropropagación se utilizan generalmente plantas germinadas *in vitro*, para garantizar que el material vegetal esté libre de contaminantes u organismos patógenos, así como para determinar las condiciones óptimas de germinación de una especie en particular.

De acuerdo con Mayer (1982), las semillas requieren ciertas condiciones de temperatura, composición de gases, luz y suficiente cantidad de agua para su germinación.

En el caso de la germinación de las semillas de *Piqueria trinervia* Cav., se cuantificó el porcentaje de respuesta en condiciones de luz y oscuridad, estratificación a bajas temperaturas (4° C), y exposición a tres diferentes temperaturas 17, 20 y 25°C.

Rojas y Ramírez (1993) consideran que el proceso de germinación se inicia cuando el embrión empieza a sintetizar giberelina, lo cual no es aparente al ojo, y termina al llegar la radícula al tamaño de 0.5 cm, que es cuando por convención general se considera que la semilla ha germinado.

En el caso del experimento de germinación en luz y oscuridad, las semillas expuestas a 16 horas de luz (1600 lux) tuvieron una respuesta de germinación de 87 por ciento, en tanto que en las semillas que no recibieron exposición alguna la respuesta fue de 58 por ciento. De acuerdo con la prueba de Tukey, hay diferencia significativa entre las dos condiciones, pues se registró un valor de significancia de $P=0.0067$, determinándose la presencia de luz como necesaria para la germinación. La respuesta de las plántulas a las condiciones de oscuridad provoca el etiolado de los tallos y aparentemente la germinación está inducida por la exposición al agua y al periodo de dormancia. Según Daubenmire (1979), las semillas de la mayoría de las plantas se

vuelven sensibles a la luz cuando están mojadas. Sin embargo, hay otros factores que interactúan para activar el metabolismo de la germinación.

Smith (1975) menciona que en muchas semillas el disparador de la germinación es cierto número de horas de frío para el embrión y que éstas pueden ser sustituidas por periodos cortos de luz o bien, en algunos casos, por giberelinas.

La exposición a bajas temperaturas también se considera como una forma de estratificación. Los propósitos de la estratificación a bajas temperaturas son obtener la postmaduración de los embriones latentes y modificar las cubiertas de las semillas (Hartmann y Kester, 1962).

La tabla 2, da la respuesta de germinación de las semillas expuestas a periodos de frío (estratificación con frío) durante 4 y 6 meses anteriores a la siembra e indica que a los 6 meses se obtuvo el mayor porcentaje de germinación con 78.6 por ciento; a los 4 meses 44.6 por ciento y el testigo con 56.6 por ciento (6 meses a temperatura ambiente), cuantificado a los 24 días de haber sido sembradas las semillas (gráfica 1).

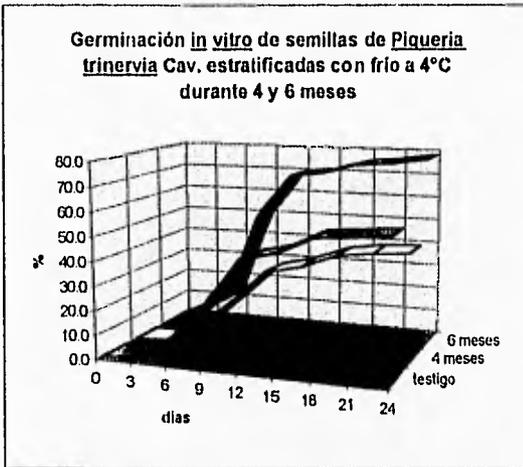
De acuerdo con Rojas y Ramírez (1993) la inducción de la germinación puede deberse a ciertas condiciones de luz o de temperatura, pues en muchas semillas estos factores externos están conectados con factores internos de inhibición. Muchas de las plantas que crecen en climas templados, tienen semillas que exigen atravesar por varias semanas de frío para poder germinar; se trata de un caso de adaptación para evitar que la semilla germine en el otoño y se vea sujeta la plántula a los rigores del invierno de esos climas, quedando en el suelo y germinando en la primavera. En este caso, las bajas temperaturas a que se somete al embrión sustituyen al paso del invierno, estimulándolas con temperaturas más altas, así como con luminosidad, las semillas salen del letargo.

Tabla 2. Germinación de semillas de *Piqueria trinervia* Cav. estratificadas con bajas temperaturas (4°C) durante 4 y 6 meses. Sembradas en agar 8 g/l, pH: 5.7, 25±2°C, 16 h luz, 1,600 lux.

Tiempo (días)	Temperatura ambiental *		Estratificación con frío (4 meses)		Estratificación con frío (6 meses)	
	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%
0	0/150	0.0	0/150	0.0	0/150	0.0
3	2/150	1.3	1/150	0.6	10/150	6.6
6	15/150	10.0	12/150	8.0	21/150	14.0
9	37/150	24.6	30/150	20.0	76/150	50.6
12	66/150	44.0	50/150	33.3	104/150	69.3
15	71/150	47.3	55/150	36.6	107/150	71.3
18	81/150	54.0	63/150	42.0	113/150	75.3
21	83/150	55.3	66/150	44.0	115/150	76.6
24	85/150	56.6	67/150	44.6	118/150	78.6

* testigo

Gráfica 1.



El efecto de la temperatura en el momento de la germinación de las semillas que se mantuvieron almacenadas a 4°C durante 6 meses se muestra en la tabla 3 y en la gráfica 2. La exposición a temperatura de 25°C alcanzó un 81.6 por ciento a los 24

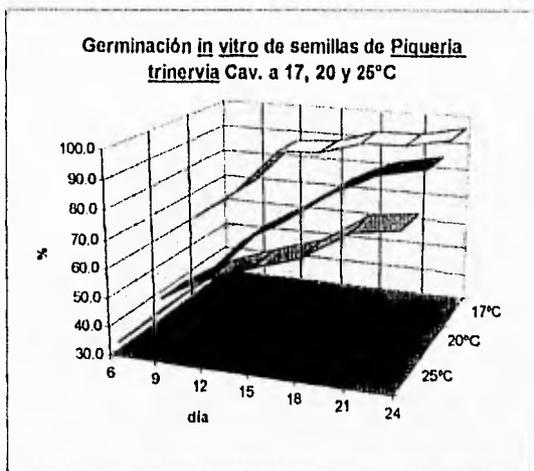
días de siembra; a 20°C, 93.3 por ciento y a los 17°C el porcentaje fue de 96.9 en el mismo periodo de tiempo. Aunque la diferencia de germinación no es muy grande entre los 17°C y 20°C, este parece ser un rango en el que se obtienen porcentajes satisfactorios de germinación. Las semillas expuestas a temperaturas menores a los 25°C alcanzaron una velocidad similar en cuanto al tiempo y número de semillas germinadas. A la temperatura de 17°C la respuesta fue más rápida, ya que a los 6 días de haber sido sembradas presentaron 60 por ciento de germinación en comparación con el 32.5 por ciento registrado en semillas a 25°C.

Tabla 3. Germinación de semillas* de *Piqueria tineryla* Cav. a temperaturas de 25, 20 y 17°C. Medio con 8 g/l de agar, pH: 5.7, 16 h luz, 1,600 lux.

Tiempo (días)	25°C		20°C		17°C	
	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%
0	0/120	0.0	0/120	0.0	0/120	0.0
3	-	-	-	-	-	-
6	39/120	32.5	45/120	37.5	72/120	60.0
9	55/120	45.8	56/120	46.6	86/120	71.0
12	70/120	58.3	75/120	62.5	105/120	87.5
15	77/120	64.2	86/120	71.6	106/120	88.3
18	83/120	69.2	99/120	82.5	112/120	93.3
21	95/120	79.2	108/120	90.0	112/120	93.3
24	98/120	81.6	112/120	93.3	116/120	96.9

*Las semillas se almacenaron durante 6 meses a 4°C previos a la siembra.

Gráfica 2.



Las semillas que se expusieron a diferentes temperaturas fueron previamente estratificadas con frío durante 6 meses a temperatura de 4°C. Al parecer la diferencia en la temperatura de almacenaje mantuvo en dormancia a las semillas y al ser expuestas a iluminación, temperaturas más altas y suficiente cantidad de agua, se desactiva el periodo de letargo y las semillas responden a los estímulos del medio.

De acuerdo a nuestros resultados los factores: luz, bajas temperaturas, humedad y un periodo de dormancia son requeridos para inducir la germinación de *Piqueria trinervia* Cav. Con ello, se lograron obtener plántulas vigorosas y con mayor desarrollo de la parte aérea, lo cual facilitó la manipulación y mayor número de explantes producidos por planta.

La talla que presentaron las plantas desarrolladas *in vitro* fue de 5 a 7 cm a la edad de dos meses, disectándose de cada planta igual número de explantes.

Cultivo in vitro

Para determinar el tipo de explante así como los reguladores de crecimiento necesarios para inducir la brotación múltiple en *P. trinervia* Cav. se utilizaron plántulas de dos meses de edad que fueron germinadas in vitro.

La edad del explante es importante ya que se tiene bien documentado que la edad de la planta stock, la edad fisiológica del explante y el estado de desarrollo pueden determinar los siguientes sucesos del cultivo (Debergh and Read, 1991). Por lo general los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciarse que los tejidos maduros.

En la tabla 4 se observa la respuesta de brotación de un experimento preliminar, en el cual se colocó como explante nudos en medio basal MS (1962) y adicionando K (1.0 mg/l) con ANA y con AIA; así como BAP (5.0 mg/l) combinado con la auxina ANA y con AIA.

Tabla 4. Respuesta de explante de tallo de 0.5 a 1 cm en medio MS (1962), adicionado con K, BAP, ANA y AIA. pH: 5.7, sacarosa: 30 g/l, 8 g/l de agar, 25±2°C, 16 h luz, 1,600 lux.

auxina l		cito- cinina →		K 1 mg/l						BAP 5 mg/l					
				Callo		Brote		Tejido oxidado		Callo		Brote		Tejido oxidado	
				respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%
ANA mg/l	0.0	0/20	0	3/20	15	17/20	85	0/20	0	4/20	20	16/20	80		
	0.1	3/20	5	1/20	5	16/20	80	13/20	65	0/20	0	7/20	35		
	0.5	6/20	40	2/20	10	10/20	50	12/20	60	2/20	10	6/20	30		
AIA mg/l	0.0	10/20	50	0/20	0	10/20	50	12/20	60	0/20	0	8/20	40		
	0.1	0/20	0	7/20	35	13/20	65	3/20	15	10/20	50	7/20	35		
	0.5	3/20	15	4/20	20	16/20	80	7/20	35	2/20	10	11/20	55		
	1.0	16/20	80	0/20	0	4/20	20	5/20	25	0/20	0	15/20	75		

Las mejores respuestas de inducción de brote se tuvieron en las concentraciones de 1 mg/l de kinetina en ausencia de AIA y con 5 mg/l de BAP en ausencia de AIA, con 35 y 50 por ciento de respuesta respectivamente. En las concentraciones de 1 mg/l de ANA más 1 mg/l de kinetina la respuesta morfogénica fue de formación de callo con un 50 por ciento, y con 1 mg/l de kinetina más 1 mg/l de AIA la respuesta de formación de callo fue de 80 por ciento, respectivamente. Por otra parte, en casi todos

los tratamientos en los que se utilizó BAP (5.0 mg/l) la respuesta fue morfogénesis indirecta, con marcadas malformaciones de tallo y hojas principalmente. Este tipo de respuesta es semejante a la reportada por Francã *et al.*, (1995) en la especie *Stryphnodendron polyphyllum* (Barbatimão) ya que utilizando BAP en concentraciones de 0.04 μ M, los explantes formaron callo en la base, con BAP combinado con AIA aunque se formaron brotes, la presencia de callo en la base redujo el vigor de los brotes

Aunque se presentaron respuestas muy bajas en todas las combinaciones del experimento preliminar, el uso de una sola citocinina en baja concentración mostró el mayor potencial organogénico. Esto se presentó también en la especie *Camellia sasanqua* en la cual se estableció que el número de brotes *in vitro* fue producido únicamente por la acción de citocininas, sin embargo esto se incrementó por la presencia de ambas, auxinas y citocininas (Torres y Carlisi, 1989). Sin embargo, dependiendo del tipo de citocinina y de la concentración se pueden obtener diferentes respuestas morfológicas. Tanto el tamaño del explante como las concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizadas en el experimento preliminar influyeron en la baja respuesta. Esto se corrobora con los resultados contrarios a los nuestros obtenidos por Pereira *et al.*, (1995) en la especie *Maytenus ilicifolia*, pues el medio más efectivo en términos de número de brotes formados fue MS suplementado con altos niveles de BAP (13.3 μ M) lo cual incrementó el número de brotes pero redujo la longitud de los mismos, en nuestro caso se presentaron malformaciones en las plantas y desarrollo de callo.

Cabe señalar que la mayor parte de los tratamientos presentaron porcentajes altos de oxidación del tejido, entre 35 y 85 por ciento. De acuerdo con Debergh y Read (1991) en los tejidos de las plantas, cuando son expuestos a daño mecánico (este es el caso del aislamiento de explante de la planta madre), es estimulado el metabolismo de compuestos fenólicos. Estos compuestos son fáciles de oxidar y pueden ser fitotóxicos o incrementar el proceso de oxidación en el tejido vegetal. Para contrarrestar el efecto que se estaba presentando de oxidación, se adicionaron a los medios 100 mg/l de ácido

ascórbico como agente antioxidante, con lo que se disminuyó casi totalmente el problema de oxidación.

El tamaño del explante utilizado (0.5 a 1.0 cm) influye en el tipo de respuesta, lo que concuerda con lo establecido por Lozoya (1985): entre más pequeño sea el explante, menor probabilidad de contaminación hay, pero también menor probabilidad de desarrollo y establecimiento del explante.

Por otra parte, en los tratamientos para inducción de brote en los cuales únicamente se utilizó kinetina, el explante generó brotes y en los tratamientos con auxinas se generó callo de consistencia friable. Esto concuerda con los reportes de Murashige (1974) y Gyulai *et al.*, (1995) en cultivo de tabaco, en el cual la organogénesis está determinada por el medio nutritivo; una alta concentración de auxinas favorece la iniciación de raíz. En contraste, altas concentraciones de citocininas inducen la iniciación de brotes y suprimen el enraizamiento.

Con los resultados del experimento preliminar se procedió a determinar qué concentraciones de citocinina (kinetina) estimulaban en mayor proporción la brotación múltiple, así como el tipo de explante.

La tabla 5 muestra el porcentaje de brotes obtenidos a partir de tres explantes diferentes, en medio MS con 1.0 mg/l de kinetina. De tallo con nudo de 0.5 a 1.0 cm, la respuesta fue de 36 a 45 por ciento. Con tallo y un par de hojas de 2.0 cm, se obtuvo entre 98 y 100 por ciento de respuesta. Posteriormente se utilizó un tercer explante procedente de brotes inducidos *in vitro*, a partir de tallo con un par de hojas; la respuesta fue de 96.6 por ciento. Los explantes A y B se obtuvieron de plantas germinadas *in vitro*.

Tabla 5. Inducción de brotación múltiple a partir de 3 tipos de explante de Piqueria trinervia Cav. cultivados en medio MS (1962), adicionado con 1.0 mg/l de K, 8 g/l de agar, 25±2°C, pH: 5.7, sacarosa: 30 g/l, 16 h luz, 1,600 lux.

Explante	Respuesta	Porcentaje	\bar{x}
A	27/60	45.0	40.3
	24/60*	40.0	
	22/60*	36.0	
B	59/60	98.3	98.8
	60/60*	100.0	
	59/60*	98.3	
C	56/60	93.3	93.3
	58/60*	96.6	
	54/60*	90.0	

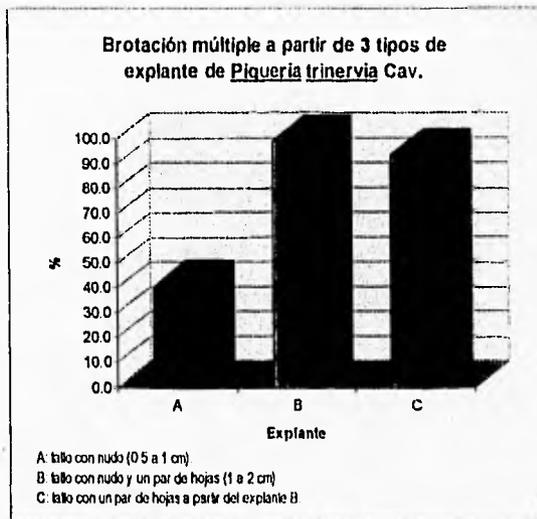
p= 0.0 Altamente significativa. * repelicones

A: tallo con nudo (0.5 a 1 cm).

B: tallo con nudo y un par de hojas (1 a 2 cm).

C: tallo con un par de hojas a partir del explante B.

Gráfica 3.



Tomando en consideración el análisis de Tukey, se presenta diferencia altamente significativa del explante A con respecto al B y C, siendo éstos dos últimos los que presentan buena respuesta tanto en la generación de brotes, como en talla y apariencia. Considerando los mismos explantes pero por peso seco, con la prueba de Tukey podemos determinar al explante B como el más adecuado para inducir la brotación múltiple en P. trinervia Cav. El peso seco determina la cantidad total de biomasa generada y es importante por el contenido del metabolito que genere la planta. Las medias registradas por explante son:

Para el explante A es 0.096 g de peso seco, explante B 0.277 g de peso seco y para el explante C 0.169 g de peso seco.

La buena respuesta del explante C pudo deberse al efecto del pretratamiento con kinetina que se le aplicó al brote del cual se obtuvo el explante, sin embargo, el explante C puede favorecer más la explotación de Piqueria trinervia Cav., ya que no se requeriría de nuevas colectas de campo, manteniendo stocks adecuados en el laboratorio con lo que se puede promover la conservación eventual de la especie. De acuerdo con George y Sherrington (1984), en algunos reportes recientes se describe el efecto de citocininas en brotes adventicios formados en plantas tratadas (u órganos de la planta de la cual el explante puede ser derivado) en cultivo in vitro.

Al parecer, el tamaño del explante, junto con el medio nutritivo, son muy importantes en la respuesta de organogénesis, a lo cual también hace referencia George y Sherrington (1984); ellos establecen que los explantes o inóculos largos, generalmente, sobreviven más frecuentemente y se desarrollan más rápidamente que los que son más pequeños. Esto es notorio en la respuesta del explante de tallo con nudo de 0.5 a 1.0 cm, ya que en las tres repeticiones se registraron porcentajes bajos.

De acuerdo con Evans et al., (1981), los explantes pequeños tienden a formar callo en contraste con los explantes grandes, que poseen mayor potencial morfogénico. Por eso requieren de un medio más completo para su crecimiento.

La respuesta de los explantes de talla mayor y en presencia de hojas se debe precisamente a que en esos sitios se localizan los meristemos o masas celulares no diferenciadas que posteriormente darán origen a nuevas hojas, así como a la síntesis de citocininas que actúan *in situ* y que activan la división celular. El crecimiento también está dado por la acción de las auxinas en presencia de las citocininas pero en concentraciones variables.

Con las concentraciones de kinetina utilizadas para inducción de brote se probaron los tratamientos M1, M2 y M3 y se cuantificó la respuesta por peso fresco para determinar la producción de biomasa, utilizando como explante tallo con un par de hojas.

Tabla 6. Respuesta de producción de biomasa en tres tratamientos con kinetina utilizando medio MS (1962), 8 g/l de agar, 30 g/l de sacarosa, pH : 5.7, 25±2°C, 16 h luz, 1, 600 lux.

Tratamiento	Respuesta	%	peso fresco/explante (g)
M1	22/24	91	2.44
M2	24/24	100	3.70
M3	17/24	80.9	2.80

P=0.3816 no hay diferencia significativa.

En el tratamiento M1, 91 por ciento de los explantes generaron brotación múltiple, con tratamiento M2 se registró 100 por ciento y en M3 fue 80.9 por ciento. La diferencia entre las tres concentraciones por promedio de peso fresco, fue ligeramente superior en el tratamiento M2 con 3.7 g por explante en comparación con el M1 (con 2.4 g/explante), y con M3 (con 2.8 g/explante). Por lo tanto, los explantes que se generaron en el tratamiento M2, con 2.0 mg/l de kinetina tuvieron mayor biomasa, lo que se puede traducir en mayor contenido de Piquero. Sin embargo, con la prueba de Tukey no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos por peso fresco. El nivel de significancia fue de P= 0.3816.

En cuanto al tamaño y tipo de explante se refiere, los que tuvieron una talla de 1.0 a 2.0 cm y presencia de hojas dieron los mejores resultados de formación de brotes

adventicios. Los explantes de 0.5 a 1.0 cm de tallo con nudo quedan descartados para la inducción de brote pero no para la formación de callo.

La ventaja que representa la organogénesis directa es la estabilidad genética de los clones obtenidos de cada planta madre, aspecto que no presentan los brotes provenientes de callo expuestos a altas concentraciones de reguladores de crecimiento.

Cuando se mantiene la organización parental, y los brotes apicales y laterales son funcionales, usualmente no se presentan mutaciones, aunque esto depende de factores tales como el sistema de propagación elegido, el tipo de reguladores usados, el tipo de tejido (diferenciado o desdiferenciado), el genotipo, cantidad de subcultivos y los niveles de ploidía de la planta (Pierik, 1988).

Por último, los brotes obtenidos se dejaron desarrollar durante mes y medio antes de inducir la raíz.

Enraizamiento

La formación de raíz es la respuesta que se induce morfogénicamente para el completo establecimiento de las plantas cultivadas in vitro a condiciones ex vitro.

De acuerdo con George y Sherrington (1984), la inducción de rizogénesis en los brotes puede llevarse a cabo durante la propagación, aunque muchas especies no necesitan un estado especial de inducción de raíz.

Comúnmente los brotes se mantienen en medios libres de reguladores de crecimiento, en presencia de citocininas la formación de raíz es inhibida para continuar con la multiplicación del brote. Sin embargo, la formación de raíz in vitro sólo se lleva a cabo en medio que contenga únicamente auxina (George y Sherrington, 1984).

Las tres auxinas empleadas en brotes de P. trinervia Cav. generaron respuestas diferentes (tabla 7).

Tabla 7. Formación de raíz *in vitro* en brotes de *Piqueria trinervia* Cav., en medio MS (1962), adicionado con 3 auxinas (AIA, ANA e IBA). pH: 5.7, sacarosa: 30 g/l, 8 g/l de agar, 25±2°C, 16 h luz, 1,600 lux.

Tratamiento	Regulador de crecimiento (0.5 mg/l)	Respuesta
R1	AIA	Frecuente formación de callo en la base del brote. Raíz de 1.0 mm, consistencia compacta. Abundancia: +
R2	ANA	Raíz principal de 3.0 mm, raíces adventicias de 1.0 mm. Consistencia parenquimatosa. Malformación en la base del tallo. Abundancia: ++
R3	IBA	Raíz principal de 2.0 mm, gran cantidad de raíces adventicias de aspecto vigoroso, compactas. No hay formación de callo en la base del brote. Abundancia:+++

De 1 a 15 raíces: +

De 20 a 30 raíces: ++

Más de 30 raíces: +++

Utilizando el tratamiento R1 se obtuvo una raíz compacta pero de escasa a nula formación de raíz. En el tratamiento R2 la formación de raíz fue de regular a abundante pero de consistencia parenquimatosa, generando callo en la base del brote. La mejor respuesta se observó en el tratamiento R3 que contenía 0.5 mg/l de IBA, la raíz formada fue abundante y de consistencia compacta, con múltiples raíces adventicias y al igual que el tratamiento R1 la vía fue organogénesis directa. Esta respuesta se presentó también en la especie *Telopea speciosissima* R. Br. (Proteaceae) en la cual el mayor número de raíces se registró en medio MS a la mitad de su concentración con 50 µM de IBA (Offord y Campbell, 1992) y en el enraizamiento del castaño, en el cual, de acuerdo con Gonçalves *et al.* (1994), el IBA juega un papel

importante en la génesis de las raíces primordiales, lo que puede afectar al número de raíces diferenciadas pero no a la morfología del sistema radicular.

Las siguientes pruebas de enraizamiento utilizando IBA en diferentes concentraciones y con medio MS al 50% de sales, generaron respuestas similares con 0.25 y 0.1 mg/l. Las raíces fueron numerosas y con múltiples raíces adventicias que impidieron su conteo pero presentaron buen aspecto en cuanto a grosor (entre 1.0 y 2.0 mm) y vigor. Con base en la apariencia y abundancia de las raíces se optimizó el uso de IBA con 0.1 mg/l en diferentes substratos.

De acuerdo con Hyndman *et al.*, (1982) una de las variables que se pueden controlar durante el enraizamiento *in vitro* es la concentración de sales. Las modificaciones a que son expuestas las plantas *in vitro* pretenden prepararlas para el trasplante a suelo e inducir el autotrofismo alterando también la intensidad de luz.

Substrato para el enraizamiento *in vitro*

La respuesta de enraizamiento utilizando como substrato agar y vermiculita se muestra en la tabla 8. Los tres lotes (repeticiones) presentan porcentajes similares y sólo en el lote 2 utilizando vermiculita se obtuvo 85% de respuesta a formación de raíz. Comparando ambos substratos, el uso de vermiculita facilitó el manejo de las plantas para transplantarse a suelo. Esto redujo el daño que frecuentemente se hace a las plantas que generan raíz en agar, ya que tienen que ser lavadas para quitar cualquier fragmento que quede adherido a la raíz.

Tabla 8. Respuesta de 2 substratos, agar y vermiculita, en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Piqueria trinervia* Cav., en medio MS (1962), al 50% de sales, suplementado con 0.1 mg/l de IBA, pH: 5.7, sacarosa: 30 g/l, 8 g/l de agar, 25±2°C, 16 h luz, 1,600 lux.

Substrato	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	respuesta	%	respuesta	%	respuesta	%
Vermiculita	15/20	75.0	17/20	85.0	10/15	66.6
Agar	14/20	70.0	15/20	75.0	12/20	60.0

De acuerdo con Aldrufe *et al.*, (1983) y Noiton (1988) se ha observado que las propiedades físicas del substrato usado durante la rizogénesis *in vitro* determinan la

iniciación, desarrollo y número de raíces de la planta. Sin embargo, Debergh (1991) menciona que la ruta clásica de enraizamiento *in vitro* es proveer de agar al medio de cultivo, lo que se propone como una alternativa para facilitar el enraizamiento de las plantas.

Los dos sustratos utilizados para enraizar brotes de *Piqueria trinervia* Cav. proporcionan el medio de sostén y retención de nutrientes para que sean captados por las plantas, aunque esta respuesta no sea homogénea siempre. Eso puede deberse al tamaño u otras características de las partículas que podrían retener los nutrientes. Sin embargo, el agar prácticamente no genera problemas, por lo que ambos sustratos, agar y vermiculita pueden utilizarse para el enraizamiento *in vitro*.

Aclimatización

El periodo de aclimatización por el que pasan las plantas desarrolladas *in vitro*, es un proceso que de acuerdo con Debergh (1991) está determinado por la calidad de la planta micropropagada. En general, los requerimientos de las plantas para su aclimatización son: alta humedad relativa, reducción de la intensidad de luz, adaptación a la temperatura y un sistema radicular bien desarrollado.

En el caso de los brotes enraizados de *Piqueria trinervia* Cav., la aclimatización se llevó a cabo en contenedores cubiertos con plástico y en condiciones de invernadero, utilizando como sustrato el suelo original donde se localizan poblaciones de la planta en estado silvestre.

Las plantas que se enraizaron *in vitro*, mostraron adaptación tanto al tipo de suelo como a las condiciones de humedad, que se lograron mantener altas, alrededor de 90%, por la presencia de cubiertas de plástico. Esta medida se tomó porque las plantas, al pasar de condiciones *in vitro* a otras *in vivo*, presentaron una rápida deshidratación que provocaba su debilitamiento. Esta característica de las plantas se debe probablemente a la ineficiencia del cierre de los estomas así como a la falta de autotrofismo. De acuerdo con Preece y Sutter (1991), lo anterior se debe a la

alteración de los estomas precisamente por el cambio de condiciones, de los niveles de luz y de humedad relativa.

En el invernadero, las plantas respondieron favorablemente a la reducción de la humedad, lo cual se llevó a cabo durante un mes y medio, esto se hizo con la finalidad de inducir a que la planta se adapte a las nuevas condiciones, además de que un decremento en la humedad relativa puede dar como resultado una mejor formación de cera cuticular y por lo tanto, menos transpiración cuticular (Pierick, 1988). Posteriormente, se les quitaron las cubiertas de plástico perforadas y las plantas se pasaron a macetas de 5 kilogramos, aplicándoles riego 2 ó 3 veces por semana, pues el suelo utilizado presentó alto drenaje.

La adaptación de las plantas se cuantificó por la presencia y desarrollo tanto de raíces como de nuevos brotes en las condiciones de invernadero, determinándose el porcentaje de sobrevivencia en 87%, sin alteración aparente en la morfología de las plantas.

Las condiciones de luz, temperatura, humedad y fertilidad del suelo, permitieron el crecimiento y desarrollo de las plantas, concluyendo con la formación de inflorescencias y la formación de semillas de las plantas producidas *in vitro* pero ya establecidas en invernadero.

El periodo de floración de *P. trinervia* Cav. que provenía de condiciones *in vitro* fue similar al periodo que presentan las plantas en el campo, fenómeno que se registró a finales del verano, cuando termina la época de lluvia en México.

Cabe mencionar que la talla que presentaron las plantas en el invernadero fue aproximadamente de 1.60 cm, superior a las plantas que se localizan en el campo. Esta característica se atribuye precisamente a las condiciones a que estuvo expuesta, como fueron el riego, la temperatura y la protección de las condiciones climáticas desfavorables, este hecho abre la posibilidad de un inicio de domesticación de la especie dadas sus potencialidades.

Características de suelos derivados de conizas volcánicas del Ajusco

El análisis de fertilidad, de tres pozos colectados en la zona del Ajusco, mostró los siguientes resultados:

Pozo 1

El color del suelo en seco es gris olivo oscuro 5Y 3/2, y en húmedo negro 5Y 2.5/1, en la profundidad de 0-20 cm. En las dos siguientes profundidades el color en seco es pardo grisáceo muy oscuro 2.5Y 3/2 y en húmedo negro, 5Y 2.5/2 (ver tabla 9).

Los valores de alofano en las tres profundidades son los más altos (XXXX) de acuerdo con la categoría cualitativa de la reacción con fenolfaleína.

La clase textural en la profundidad 0-20 cm y 40-60 cm es arena francoso, con excepción de la 20-40 cm, que presenta la clase de arena.

La densidad aparente es superior en la muestra 0-20 cm con 1.40 g/cc y disminuye con la profundidad hasta 1.27 g/cc. La densidad real (D.R.) se mantuvo constante entre 2.74 y 2.79 g/cc. En cuanto a la porosidad, ésta se mantiene entre 49.65 y 53.64%, considerada dentro de un rango alto.

El pH es ligeramente ácido de 6.45 y varía hasta 7.2 con agua destilada en relación 1:2.5. En el caso del pH con KCl en la misma relación, el valor en las dos primeras profundidades es de 5.7 y en la profundidad 40-60 cm es de 5.8.

El porcentaje de M.O. es en la superficie, de 1.39%, y disminuye con la profundidad hasta 0.42 y 0.62%, los porcentajes de carbono son de 0.80%, 0.24% y 0.36%.

Los cationes intercambiables, en el caso del Ca^{++} , muestran valores de 2.74 a 3.29 meq/100 g de suelo, valores que aumentan en razón de la profundidad. Para el Mg^{++} se registran valores de 3.72 meq/100 g de suelo en la superficie y 1.59 en las dos siguientes profundidades.

El Na^+ presenta valores entre 0.74 y 0.86 meq/100 g de suelo, el valor más alto corresponde a la superficie, y disminuye a 0.74 para aumentar nuevamente. En relación al K^+ los meq/100 g de suelo se sitúan alrededor de 0.15 en la profundidad 20-40 cm. Tanto en la superficie como en la capa más profunda los valores son de 0.39 y 0.23, respectivamente.

Al parecer, el Ca^{++} es el catión que se encuentra en mayor cantidad, pero disminuye cuando es alta la del Mg^{++} . En comparación con el Na^+ y el K^+ , sin embargo, los valores son altos; el Na^+ se encuentra en mayor concentración que el K^+ , pero con la profundidad no se muestra una clara relación.

La capacidad de intercambio catiónico total (CIC^T), es de 3.15 a 3.58 meq/100 g de suelo para las profundidades de 0-20 cm y 40-60 cm, siendo valores bajos en general, pero mayores en la superficie en relación con la profundidad.

La cantidad registrada de nitrógeno total fue de 0.184, 0.086 y 0.084 por ciento, en orden decreciente de profundidad.

Pozo 2

El color del suelo en seco a lo largo del pozo es 2.5Y 4/2, correspondiente al pardo grisáceo; en el caso de determinación en húmedo es 5Y 2.5/1 (negro) en la mayor parte del pozo (ver tabla 10).

Al igual que en el pozo 1, la cantidad de alofano cuantificada cualitativamente es la más alta (XXXX).

La textura es arena franco a lo largo del perfil con porcentajes de 84.4 a 86.4% de arena.

La densidad aparente registra un valor de 1.28 g/cc en la superficie y aumenta en las dos siguientes profundidades a 1.33 g/cc. La densidad real es prácticamente constante, con 2.59 a 2.66 g/cc, ligeramente superior en razón de la profundidad.

El pH con agua varía, de 6.3 en la superficie, a 6.6 en relación 1:2.5 en las dos siguientes profundidades. La escala registrada con KCl en la misma relación tuvo valores de 5.5 a 5.4.

La materia orgánica es mayor en la superficie con 4.11% y disminuye con la profundidad a 3.62 y 3.55%. Los datos de porcentaje de carbono presentan el mismo comportamiento presentando valores de 2.38 a 2.06.

El Ca^{++} intercambiable varía de 6.04 a 5.49 meq/100 g de suelo, el Mg^{++} varía de 1.06 a 0.53 meq/100 g de suelo. Ambos cationes mostraron los valores más altos en la profundidad 0-20 cm.

El Na^+ intercambiable se incrementa a partir de la superficie, de 0.86 a 0.92 meq/100 g de suelo, a diferencia del K^+ , cuyos valores son mayores en la superficie con 0.58%, y disminuyen a 0.29 meq/100 g de suelo.

La CICT varía de 11.40, 13.41 a 11.34 meq/100 g. en razón de la profundidad.

El nitrógeno total fue de 0.18, 0.16 y 0.098%, disminuyendo considerablemente con la profundidad, comportamiento que se asemeja al de la M. O.

Pozo 3

El color en seco es de 10YR 6/4 (pardo amarillento claro) en la superficie, 10YR 6/6 (amarillo pardusco) en la profundidad 20-40 cm y 10YR 6/8 (amarillo pardusco) en la profundidad 40-60 cm. En húmedo se observa el mismo color pardo amarillento oscuro, 10YR 3/4 y 10YR 3/6 a lo largo del pozo (ver tabla 11).

El alofano cuantificado es mayor en la superficie, con XXX. En las siguientes dos profundidades es de XX.

La textura predominante es franco arenoso a lo largo del pozo, con porcentajes de 20 a 28 de limo, de 3.6 a 6 de arcilla y de 66 a 74 de arena.

La densidad aparente (D.A.) tiene valores mayores en la superficie, con 1.25 g/cc y disminuye a 1.05 g/cc conforme la profundidad se incrementa. La densidad real (D.R.) se presenta constante entre 2.41 y 2.46 g/cc. El espacio poroso presenta de 49.18 a 56.79 por ciento, aumentando con la profundidad.

El pH es ligeramente alcalino (6.9 a 7.0) con agua en relación 1:2.5, y ligeramente ácido con KCl, con valores de 5.5 a 5.7.

La materia orgánica es mayor en la superficie y desciende con la profundidad mostrando valores de 2.02, 1.18 y 0.90%, comportamiento que se asemeja a la proporción de carbono, que es de 1.17 a 0.52 por ciento.

El Ca^{++} presenta variaciones a lo largo del pozo. En la superficie es de 4.39 meq/100 g de suelo, aumenta a 6.04 meq/100 g de suelo y vuelve a disminuir a 2.47 meq/100 g de suelo. El Mg^{++} se mantiene casi constante, con valores entre 2.19 y 2.74 meq/100 g de suelo.

El Na^+ es mayor en la superficie, con 0.97 meq/100 g de suelo y presenta el mismo comportamiento que el Ca^{++} , con 0.80 y 0.86 meq/100 g de suelo. El K^+ presenta 0.93 meq/100 g de suelo y aumenta con la profundidad a 1.97 meq/100 g de suelo. Al parecer se presenta antagonismo entre los diferentes cationes.

La CICT a lo largo del pozo muestra valores de 13.50, 16.43 y 15.88 meq/100 g de suelo, aumenta conforme a la profundidad.

El porcentaje de nitrógeno es de 0.095 en la muestra 0-20 cm y disminuye a 0.067 en los 20-40 cm y 0.053 en la muestra 40-60 cm.

Tabla 9. Resultado de los análisis físico-químicos del pozo 1.

Km. 12 Carretera Médico-Ajusco, Geología: zona ubicada en la sierra de Chichinautzin, material parental de roca ígnea extrusiva, suelo Andosol, derivado de cenizas volcánicas. Altitud: 1,400 msnm. Clima: Cb'(w2)(w)ig Templado. Precipitación media anual entre 700 a 1500 mm. Temperatura media anual entre 12° y 18°C. Vegetación: bosque de pino.

cm	COLOR		TEXTURA			D.A. g/cc	D.R. g/cc	POROSIDAD %	pH 1:2.5		ALOFANO	M.O. %	C %	N %	C.I.C.T. meq/100g	Ca ⁺⁺ meq/100g	Mg ⁺⁺ meq/100g	Na ⁺ meq/100g	K ⁺ meq/100g
	SECO	HUMEDO	% ARENA	% LIMO	% ARCILLA				H2O	KCl									
0-20	5Y 3/2 GRIS OLIVO OBSCURO	5Y 2.5/1 NEGRO	86.2	12.2	1.6	1.4	2.78	49.65	6.45	5.7	XXXX	1.39	0.8	0.185	3.58	2.74	3.72	0.86	0.39
20-40	2.5Y 3/2 PARDO GRISACEO MUY OBSCURO	5Y 2.5/2 NEGRO	94.4	5.6	0	1.36	2.79	51.25	7.1	5.7	XXXX	0.42	0.24	0.086	3.16	3.29	1.59	0.74	0.15
40-60	2.5Y 3/2 PARDO GRISACEO MUY OBSCURO	5Y 2.5/1 NEGRO	88	12	0	1.27	2.74	53.64	7.2	6.8	XXXX	0.62	0.36	0.08	3.58	3.29	1.59	0.8	0.23

Tabla 10. Resultado de los análisis físico-químicos del pozo 2.

Km. 12 Carretera México-Ajusco. Geología: zona ubicada en la sierra de Chichinautzin, material parental de roca ígnea extrusiva, suelo Andosol, derivado de cenizas volcánicas.
 Altitud: 1,400 msnm. Clima: Cb' (wZ)(w)lg Templado. Precipitación media anual entre 700 a 1500 mm. Temperatura media anual entre 12° y 18°C. Vegetación: bosque de pino.

cm	COLOR		TEXTURA			D.A. g/cc	D.R. g/cc	POROSIDAD %	pH 1:2.5 H ₂ O KCl		ALOFANO	M.O. %	C %	N %	C.I.C.T. meq/100g	Ca ⁺⁺ meq/100g	Mg ⁺⁺ meq/100g	Na ⁺ meq/100g	K ⁺ meq/100g
	SECO	HUMEDO	% ARENA	% LIMO	% ARCILLA														
0-20	2.5Y 4/2 PARDO GRISACEO	5Y 2.5/1 NEGRO	86.4	12	1.6	1.28	2.59	50.68	6.3	6.6	XXXX	4.11	2.38	0.179	11.4	6.04	1.06	0.86	0.59
20-40	2.5Y 4/2 PARDO GRISACEO	5Y 2.5/2 NEGRO	84.4	12	3.6	1.33	2.6	48.84	6.7	6.4	XXXX	3.62	2.09	0.159	13.41	5.45	1.06	0.86	0.39
40-60	2.5Y 4/2 PARDO GRISACEO	5Y 2.5/1 NEGRO	84.4	14	1.6	1.33	2.66	60	6.7	5.4	XXXX	3.65	2.06	0.098	11.34	5.49	0.63	0.82	0.29

Tabla 11. Resultado de los análisis físico-químicos del pozo 3.

Km. 12 Carretera México-Ajusco. Geología: zona ubicada en la sierra de Chichinautzin, material parental de roca ígnea extrusiva, suelo Andosol, derivado de cenizas volcánicas.
 Altitud: 1,400 msnm. Clima: Cb'(w2)(w)ig Templado. Precipitación media anual entre 700 a 1500 mm. Temperatura media anual entre 12° y 18°C. Vegetación: bosque de pino.

cm	COLOR		TEXTURA			D.A.	D.R.	POROSIDAD		pH 1:2.5		ALOFANO	M.O.	C	N	C.I.C.T.	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
	SECO	HUMEDO	% ARENA	% LIMO	% ARCILLA	g/cc	g/cc	%	H ₂ O	KCl	%	%	%	%	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g	meq/100g
0-20	10YR 6/4	10YR 3/4	74	20	6	1.25	2.46	49.18	6.9	5.5	XXX	2.02	1.17	0.09	13.5	4.39	2.19	0.97	0.93	
	PARDO AMARILLENTO CLARO	PARDO AMARILLENTO OSCURO	FRANCO ARENOSO																	
20-40	10YR 6/5	10YR 3/6	72.4	24	3.6	1.07	2.41	55.6	7.1	5.7	XX	1.18	0.68	0.067	16.43	6.04	2.19	0.8	1.72	
	AMARILLO PARDUSCO	PARDO AMARILLENTO OSCURO	FRANCO ARENOSO																	
40-60	10YR 6/5	10YR 3/4	66	28	6	1.05	2.43	56.79	7	5.6	XX	0.9	0.52	0.05	15.88	2.47	2.74	0.86	1.97	
	AMARILLO PARDUSCO	PARDO AMARILLENTO OSCURO	FRANCO ARENOSO																	

Los tres pozos presentan altos porcentajes de arena, lo cual hace susceptible el suelo a erosiones eólica e hídrica. La pendiente que se presenta en general en los suelos que albergan grandes extensiones de bosque, permite definir al de los pozos como un suelo de tipo forestal. Se recomienda su uso como tal y la explotación racional de los recursos bióticos, que no perturben demasiado la zona.

Una de las características más notables de los suelos derivados de cenizas volcánicas, presente en los pozos analizados, es la textura. Los porcentajes de arena están por arriba del 80% en los dos primeros pozos y la textura predominante es arena franco. En el caso del tercer pozo la relación de arena es de 70%, con valores más altos de limo y arcilla que en los pozos 1 y 2, y la textura es franco arenosa. Esta característica resta plasticidad al suelo y reduce la retención de agua debido al tamaño y propiedades de las partículas presentes, lo que provoca una rápida infiltración de agua.

Las densidades son relativamente bajas por la presencia de materiales piroclásticos de consistencia porosa y de bajo peso, característica que se comprueba con las proporciones de 40 a 56% de porosidad, proporcionando buena aereación al suelo, buen desarrollo de las raíces y de los organismos que en él se encuentran.

El pH que se registró con agua en relación 1:2.5 oscila entre 6 y 7 en los tres pozos, y es de carácter ligeramente más ácido con KCl, con valores de 5.4 a 5.8 en relación 1:2.5. No hay una clara diferencia de los datos registrados en cuanto a la profundidad de las muestras, pero se sabe que esta ligera acidez se debe a la pérdida de cationes por lixiviación o erosión del suelo, aunque la vegetación presente aminora en gran medida la acción de estos agentes.

El color predominante en seco es pardo grisáceo y en húmedo es negro para dos de los tres pozos, esto se debe a la presencia de elementos ferromagnesianos y de origen parental.

En general, los porcentajes de materia orgánica son bajos, presentan un rango de 0.90 como valor mínimo y 4.11 como máximo. La cantidad registrada en la superficie fue

siempre mayor que en la profundidad. Esto se atribuye a factores climáticos y al depósito y poca degradación del material orgánico, lo que permite su acumulación y posterior incorporación como nutrientes disponibles para las plantas. Sin embargo, la escasa materia orgánica que se registró parece ser el producto de factores como perturbación de la zona por introducción de animales así como por el saqueo de la cubierta vegetal y su comercialización como tierra de hoja.

La CICT se considera de carácter bajo para el pozo 1, con valores de 3.15 a 3.58 meq/100 g de suelo. Para el número 2 va de 11.34 a 13.41 meq/100 g de suelo. En el caso del pozo 3 los valores mostrados están entre 13.50 y 16.43 meq/100 g de suelo, determinándose como de carácter medio. Estos valores concuerdan con los bajos porcentajes de materia orgánica y de limos y arcillas, que tienen entre otras propiedades el proporcionar y retener nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo vegetal.

Acercas de los cationes intercambiables, se tienen contenidos bajos de Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ para los tres pozos, con fluctuaciones en las cantidades registradas en profundidad. El Na^+ y el K^+ mostraron valores pequeños con respecto al Ca^{++} y al Mg^{++} . Esta característica se presentó en los tres pozos muestreados.

De acuerdo con Salisbury y Jensen (1988) la presencia de cationes en pequeñas cantidades tiene efecto sobre la fisiología de las plantas. El Mg^{++} forma parte de la clorofila y activa numerosas enzimas. En cuanto al Ca^{++} , éste puede ser esencial para la síntesis y estabilidad de la lámina media, manteniendo la estructura y permeabilidad de la membrana, se considera que es necesario para el crecimiento de los meristemas. El K^+ es esencial en todos los procesos metabólicos celulares, y en forma aparente tiene un papel específico influyendo en la absorción de algunos otros elementos minerales regularizando el grado de respiración, afectando la relación de transpiración y es posible que también influyendo en la acción de las enzimas así como en la síntesis y traslocación de los carbohidratos, de este modo incrementa el espesor de las paredes celulares y la resistencia del tallo (Millar *et al.*, 1978).

Aunque no se determinaron todos los nutrientes que contiene el suelo, el análisis de fertilidad y el desarrollo de las plantas muestran la asimilación de los nutrientes, por lo que no se registraron síntomas de deficiencia en las plantas desarrolladas en estos suelos.

La cantidad de nitrógeno total registrada en la zona de estudio muestra valores bajos, pero sólo en relación con la cantidad de materia orgánica cuantificada. Lo anterior, aunado a la proporción de material coloidal y a las características que se derivan de la abundante fracción de arena, hacen a estos suelos aptos para el desarrollo y aprovechamiento de productos forestales, no así para el cultivo en extenso de productos agrícolas.

La especie Piqueria trinervia Cav., al igual que muchas plantas que se desarrollan en estos suelos y en condiciones climáticas semejantes, y que presentan un uso potencial, podría ser explotada bajo un programa de conocimiento de la población, su permanencia en los hábitats naturales y los diferentes usos o provechos que puedan generarse.

Conclusiones

- Con base en el conocimiento de cultivo de tejidos vegetales se llevó a cabo la micropropagación y establecimiento en invernadero de la planta Piqueria trinervia Cav.
- En la germinación se establecieron, como condiciones óptimas,
 - a) la presencia de luz, que genera 87% de respuesta, en comparación con el 58% en condiciones de oscuridad;
 - b) un periodo de dormancia, ya sea inducido por tiempo de almacenamiento o por periodos de frío. La condición óptima de dormancia se determinó en 6 meses a 4°C y generó una respuesta de 78.6% de germinación a los 24 días posteriores a la siembra;
 - c) Las semillas que se mantuvieron almacenadas 6 meses a 4°C y posteriormente germinaron en temperaturas de 17, 20 y 25°C, si bien la temperatura no es determinante en la cuantificación de la respuesta, sí lo es en cuanto a velocidad de germinación, generando una respuesta de 96.6% a los 24 días con 17°C, y de 81.6% con 25°C en el mismo periodo.
- El tipo de explante que generó mayor biomasa en peso seco fue el B, a partir de tallos con un par de hojas obtenidos de plantas germinadas in vitro. El mismo tipo de explante, pero proveniente de brotes in vitro generó brotación múltiple con 93.3% de respuesta. El explante A, de tallo de 0.5 a 1.0 cm dió muy bajos porcentajes de respuesta, tanto de biomasa por peso seco, como por peso fresco e inducción de brotación múltiple. No hubo diferencia significativa en cuanto a peso fresco con B y C. De acuerdo con lo anterior, se descarta el uso del explante A con fines de inducción de brotación múltiple.

- El regulador de crecimiento que generó brotación múltiple, vía organogénesis directa, fue la kinetina, en medio MS. Este tipo de respuestas genera material estable en cuanto a su información genética ya que es conocido que la fase de callo anterior a la formación de brote puede inducir variación somaclonal. Las concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de K, en base a la prueba de Tukey por peso fresco, no mostraron diferencia significativa, por lo que se contempló el uso de 1.0 mg/l de K como inductor de brotación múltiple.
- Se descartó el uso de concentraciones altas de BAP (5 mg/l) como inductor de brotación, así como el AIA y ANA, pues la respuesta morfogenética fue hacia inducción de callo, al menos en las concentraciones reportadas en este trabajo.
- La inducción de raíz se estableció en medio MS al 50% con IBA en concentraciones de 0.5, 0.25 y 0.1 mg/l. El uso de AIA generó callo en la base del tallo y con 0.5 mg/l de ANA se obtuvieron malformaciones de tallo y raíz.
- Los substratos utilizados (agar y vermiculita) presentaron respuestas similares, con un máximo de 75% y 85% respectivamente de formación de raíz, en medio MS al 50% de sales con 0.1 mg/l de IBA.
- La aclimatación se logró manteniendo constante la humedad relativa de las plantas en condiciones de invernadero para reducirla gradualmente más tarde. El establecimiento en vermiculita facilitó su trasplante y evitó el daño de las raíces al pasarlas a suelo. En la adaptación de las plantas a las condiciones in vivo se obtuvo un éxito del 87%.
- El análisis de fertilidad del suelo proporcionó datos suficientes para garantizar el establecimiento de las plantas, de condiciones in vitro, a in vivo.
- Las características más sobresalientes de los análisis físico y químico de los suelos derivados de cenizas volcánicas son la textura de clase franco arenoso y la alta retención de fósforo, aunado a la pendiente y alta susceptibilidad a la erosión hídrica. La porosidad registrada permite la aereación necesaria para el desarrollo

de las raíces y microorganismos. Por otra parte, la rápida penetración del agua determina la elevada frecuencia de riego, aspecto que limita en gran medida el uso de estos suelos para cultivos en extenso.

- Tomando en consideración el tipo de suelo y las características de la zona, se determinó que el Ajusco es un lugar de carácter forestal en el que podrían explotarse las especies nativas, en aquellas partes donde no haya pendientes pronunciadas. Ello, sin provocar más daños en tal zona boscosa, ya que los asentamientos humanos que se ha visto se han ido incrementando con el tiempo, ponen en riesgo el frágil equilibrio de la zona
- Se llevó a término la micropropagación de la planta hasta la formación de inflorescencias en condiciones de invernadero, completando el ciclo de vida de la planta, con obtención de semillas que fueron fértiles in vitro.
- La presente investigación se propone como una base para la propagación, conservación y uso sostenible con una eventual domesticación de la planta Piqueria trinervia Cav., ante cualquier propuesta de uso comercial que pueda generarse, dada la importancia de sus compuestos químicos. La metodología desarrollada puede también servir para otras especies que presenten fines similares de explotación o propiedades de interés para el hombre.

Apéndice 1

Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

		g/10 l	g/20 l
Macronutrientes	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	16.5	33.0
stock 1	KNO_3	19.0	38.0
20 X 400 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	7.4
	KH_2PO_4	1.7	3.5
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4	8.8
stock 2			
20 X 200 ml	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.16601	0.33602
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.086	0.172
Micronutrientes	H_3BO_3	0.062	0.124
stock 3	KI	0.0083	0.0166
20 X 200 ml	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.005
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00025	0.0005
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00025	0.0005
Stock 4	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.278	0.556
20 X 200 ml	Na_2EDTA	0.373	0.746
Vitaminas	tiamina	0.001	0.002
stock 5	ac. nicotínico	0.005	0.01
20 X 200 ml	piridoxina	0.005	0.01
Stock 6	Inositol	1.0	2.0
20 X 200 ml			
Stock 7	Glicina	0.02	0.04
20 X 200 ml			

Bibliografía

- AGUILERA, H. N. 1965. Suelos de Ando: Génesis, Morfología y Clasificación. Serie de Investigación No. 6, Colegio de Posgraduados de Chapingo, México (1964). Mem. 1er. Cong. Nac. de la ciencia del Suelo. México, D. F. p 1-12.
- AGUILERA, H. N. 1989. Tratado de Edafología de México. Tomo I. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 222 pp.
- ALDRUFEU, A., M. PAGES, J. MESSEGUER., AND E. MELE. 1983. *In vitro* rhizogenesis in different substrates. Acta Hort. 150: 315-323.
- BARBA, A. A. 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. 48-66. En: Hurtado, M. D. y M. E. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. México. Trillas. p 48-66.
- BAVER, L. D. 1956. Soil Physics., Ed. 3., Wiley, New York.
- BOLHMAN, F., AND A. SUWITA. 1978. New Terpene derivates from Piqueria trinervia Plitochemistry. 17:560.
- CETENAL CARTA EDAFICA, , 1976. Escala 1:50,000.
- CEPEDA, D. J. 1985. Química de suelos. Univ. Aut. Antonio Narro. Coahuila. 141 pp.
- CROCOMO, J., E. AQUARONE., AND O. R. GOTTLIEB. 1981. Biosynthesis of Secondary Products *in vitro*. In: T. A. Thorpe. Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York. 359 pp.
- CRUZ-REYES, A., C. CHAVARIN., M. CAMPOS., J. TABOADA Y M. JIMENEZ. 1989. Actividad Molusquicida del Piquero! A aislado de Piqueria

trinervia (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. Mem. Ins. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 84 (1): 35-40.

CRUZ, O. R., A. L. ANAYA, M. GAVILANES-RUIZ., S. SANCHEZ., AND M. JIMÉNEZ. 1990. Effect of Diacetyl Piquerol on H⁺ ATPase activity of microsomes from Ipomoea purpurea. Journal of Chemical Ecology. Vol. 16 No. 7: 2253-2261.

CRONQUIST, A. 1981. An Integrated System of clasification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1202 pp.

DAUBENMIRE, F. 1979. Ecología Vegetal. Tratado de Autoecología de Plantas. Ed. Limusa. México. 496 pp.

DEBERGH, P., Y L. J. MAENE. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Science Hort 14: 335-345.

DEBERGH, P. 1991. Acclimatization Techniques of plants from in vitro. Acta Horticulturae. 289: 291-299.

DEBERGH, P., AND P. E. READ. 1991. Micropropagation. 1-29. En: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation, Teclunology and Aplication. Klumer Academic Publishers, Dordrecht.

DIXON, D. A. 1991. Plant Cell Culture. The Practical Approach Series. Oirl Press. Oxford, England. p 91-97.

DONELLY, D. J., AND W. E. VIDAVER. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transfered from culture to soil. Journal Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (2): 172-176.

EVANS, D. A., W. R. SHARP, P. V. AMMIRATO, , AND Y. YAMADA. (Eds). 1983. Handbook of plant cell culture, Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. McMillan Publising Co. New York. p 177-227.

EVANS, D., W. SHARP., AND C. FRICK. 1981. Growth and Behavior of cell culture: Embriogenesis and organogenesis. 43-113. In: T. A. Thorpe. (Ed.). Plant

Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.

EVENARI, M. 1949. Germination inhibitors. Bot. Rev. 15: 153-194.

FRANCA, C. S., I.B. DUARTE., R. M. MORAES AND A. M. S. PEREIRA. 1995. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphytum* (Barbatimão). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42:291-293.

FIELDS, M. AND W. PERROTS. 1966. The nature of allophane in soils III. Rapid Test for laboratory and field for allophane. N. Z. J. Sci. 9: 623-629.

GARCIA, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. México. 213 pp.

GEORGE, E. F. AND P. D. SHERRINGTON. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegenetic, Limited. Great Britain. 690 pp.

GONCALVES, J. C., S. AMANCIO., AND SANTOS-PEREYRA. 1994. Rooting and acclimatization of chesnut by *in vitro* propagation. 303-308. In: P. J. Lumsden., J. R. Nicholas and W. J. Davies (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Klumer Academic Publishers. Netherlands.

GONZALEZ DE LA PARRA, M., A. L. ANAYA., F. ESPINOSA., M. JIMENEZ., Y R. CASTILLO. 1981. Allelopathic potencial of *Piqueria trinervia* Cav. (Compositae). Jour. Chem. Ecol. 7: 509-515.

GROUT, B. W. W., AND J. M. ASTON. 1977. Transplanting cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xilem regeneration. Hort. Res. 17: 1-7.

GYULAI, G., J. KISS., Z. JEKKELE., E. KISS., AND L. E. HESZKY. 1995. A Selective Auxin and Cytokinin Bioassay Based on Root and Shoot Formation in vitro. J. Plant Physiol. 145: 379-382.

HARTMANN, T. H. Y D. E. KESTER. 1962. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. Ed. Continental. México, D. F. pp 167-169.

HIDALGO, M. C. M. I. 1988. Características y dispersión en suelos de Ando. Tesis de Licenciatura (Químico Industrial). Esc. Ciencias. Quim. U. A. P. Puebla. 210 pp.

HURTADO, D., Y M. E. MERINO. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México, D. F. 230 pp.

HYNDMAN, S.E., P.M. HASEGAWA., AND R. A. BRESSAN. 1982. Stimulation of root initiation from culture rose shoots through the use of reduced concentration of mineral salts. Hort Science 17: 82-83.

ICOMAND, (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE CLASSIFICATION OF ANDISOLS). 1988. Circular letter No. 10. 29 february 1988. From: M. L. Leamy, New Zealand Soil Bureau, DSIR, Private Bag, Lower Hutt, New Zealand. Compiled by: R. L. Parfitt, C. W. Childs, B. Clayden, M. L. Leamy, D. I. Kinloch. p 5-6.

JACKSON, L. M. 1982. Análisis Químico de Suelos. Omega. Barcelona.

JIMENEZ, M., Y M. GONZALEZ DE LA PARRA. 1982. Nuevo Alcohol Diterpénico Aislado de Piqueria trinervia Cav. Rev. Latinoamer. Quim. 14: 20-23.

KING, R. M., AND H. ROBINSON. 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Monographs in systematic botany from the Missouri, Botanical Garden. St. Louis. Vol. 22. 581 pp.

KOSAI, T., Y. IWANAMI, AND K. FUJIWARA. 1987. Effects of CO₂ enrichment of the plantlet growth during the multiplication stage. *Plant Tissue Culture Lett.* 4: 22-26.

LEE, N., H. Y. WETZSTEIN, AND H. E. SOMMER. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 (1): 167-171.

LOZOYA, H. 1984. Micropropagación Vegetal. CONACYT., México, D. F. pp 63-69

LOZOYA, H. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. 65-80. En: M. Robert y V. M. Loyola (Comp.). *El Cultivo de Tejidos en México.* CICY y CONACYT. México, D. F.

MAYER, A., AND A. POLJAKOFF-MAYBER. 1982. The germination of seeds. (3^a Ed.). Pergamon Press. 211 pp.

MARTINEZ, M. 1959. *Plantas Medicinales de México.* Ed. Botas. 179 pp.

McVAUGH, R. 1984. *Flora Novo-Galiciana, Vol 12. Compositae.* Univ. Michigan press. Ann Arbor. 1157 pp.

MERINO, M. M. E. 1985. Medio de cultivo. 67-85. En D. Hurtado y M. E. Merino. *Cultivo de Tejidos Vegetales.* Trillas. México.

MILLAR, C. E., L. M. TURK AND H. D. FOTH. 1978. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. CECOSA. México. p 323-355

MUNSELL COLOR COMPANY. 1975. *Munsell Soil color chart.* Baltimore Maryland. USA.

MURASHIGE, T., AND F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.

- MURASHIGE, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Physiol Plant.* 25: 135-166.
- NARAYANUSWAMY, S. 1977. Phytomorphology. 179-206. In: J. Rainert y Y. P. S. Bajaj. (Eds). *Applied fundamentals aspects of plant cell, tissue and organ culture.* Springer-Verlag.
- NAVARRO, C., C. TEISSON., C. FRANCOIS., AND J. GANRY. 1994. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa AAA*, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. *Scientia Horticulturae.* 60: 41-54.
- NOIFON, D. 1988. Adventitious root formation in the apple. PhD Thesis, University of Sidney, Sydney. In: A. C. Offord. And L. C. Campbell. *Micropropagation of Telopea speciosissima R. Br. (Proteaceae).* 2: Rhizogenesis and acclimatization to ex vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*
- OFFORD, A. C. AND L. C. CAMPBELL. 1992. *Micropropagation of Telopea speciosissima R. Br. (Proteaceae).* 2: Rhizogenesis and acclimatization to ex vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 29:223-230.
- ORTIZ, B. E. 1995. La familia Asteraceae en el estado de Nayarit. Tesis de Licenciatura (Biólogo). UNAM. México.
- ORTIZ, S. C. A. 1987. Evaluación de las tierras de México para la producción de maíz, frijol y sorgo en condiciones de temporal. Serie cuadernos de Edafología 8. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- ORTIZ, B. Y C. A. ORTIZ. 1984. Edafología. UACH. México. 374 pp.
- PARAY, L. 1953. Las compuestas del Valle Central de México. *Soc. Bot. Mex.* 15: 1-12.

- PARFITT, R. L. AND B. CLAYDEN. 1991. Andisols-The development of a new order in Soil Taxonomy. *Geoderma*. 49: 181-198.
- PEREIRA, A. M. S., J. R. MORO., R. M. M. CERDEIRA AND S. C. FRANCA. 1995. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of Maytenus ilicifolia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 295-297.
- PIERIK, R. L. M. 1988. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*. 230: 63-69.
- PREECE, J. E. AND G. E. SUTTER. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. 71-93. In: P. G. Debergh. and R. H. Zimmerman (Eds). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- ROBERT, M. Y V. M. LOYOLA (Comp.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. p 21-26. En: M. Robert y V: M: Loyola (Comp.) *El Cultivo de tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACYT. México, D. F.
- ROBINSON, B. L. 1906. Revision of the genus Piqueria. *Proc. Amer. Acad. Arts*. 42: 4-16.
- ROJAS, G. M. Y H. RAMÍREZ. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. *Fisiología-Tecnología-Experimentación*. 2ª Ed. Limusa. México, D. F. 262 pp.
- ROMO, J., A. ROMO DE VIVAR., L. QUIJANO., T. RIOS., Y E. DIAZ. 1970. Los componentes terpenoides de la Piqueria trinervia Cav. *Rev. Latinoam. Química*, 1:72-81.
- RUBIO, M., A. V. BUNGE., Y M. JIMENEZ. 1985. Estructura electrónica del Piquerol A y B. *Rev. Latinoam. Quím*, 16:69-72.

RUBLUO, A. 1985. Estrategias para la preservacion del germoplasma in vitro. 35-55. En: M. Robert y V. M. Loyola (Comp.). El Cultivo de Tejidos Vegetales en México, CICY y CONACYT. México, D. F.

RUBLUO, A., A. FLORES., M. JIMÉNEZ AND I. BRUNNER. 1995. Piqueria trinervia Cav., (St. Nicholas Herb): In vitro Culture and the Production of Piquerol. 377-387. In Y. P. S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 33. Medicinal Aromatic Plants VIII. Springer-Verlag Berlag Berlin Heidelberg

RZEDOWSKI, J. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México, Vol. II. Inst. de Ecología, México. p 467-468.

SALISBURY, B. F. Y W. A. JENSEN. 1988. Botánica. (2ª Eds.). Mc Graw Hill, México. p. 256-282

SÁNCHEZ, E. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en la Investigación Básica. 111- y 125. En: M. Robert y V. M. Loyola (Comp.). El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY CONACyT. México, D. F

SANTAMARÍA, J. M. AND W. J. DAVIES. 1994. Control of water loss by delphinium plants cultured in vitro. 155-164. In: P. J. Lumsden., J. R. Nicholas. and W. J. Davies. (eds) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Klumer Academic Publishers. Netherlands.

SHACKEL, K. J., V. NOVELLO., AND E. G. SUTTER. 1990. Stomatal and cuticular conductance in whole tissue-culture apple shoots. J. Am. Soc. Hort. Sci. 115 (3): 468-472.

SMITH, H. 1975. Phytochrome and Photomorphogenesis. p 46-49. In: A. M. Mayer and A. Poljakoff-Mayer.(Eds). The Germination of Seeds. Pergamon Press.

THORPE, A. 1981. Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.

TORRES, K. C. AND J. A. CARLISI. 1989. Shoot and root organogenesis of Camellia sasanqua

VILLALOBOS, V. M. 1985. Las bases morfológicas en la micropropagación de especies perennes. p 55-64. En: M. Robert y V. M. Loyola (Comp.). El Cultivo de Tejidos en México. CICY y CONACYT. México, D. F.

WHO. 1983. Report of the scientific working group on plant molluscicide & guidelines for evaluation of plant molluscicides. Genova (TDR/SCH-SWG (4)/83.31, p. 11.