

00373



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" Evaluación de respuestas morfogenéticas *in vitro* en *Prosopis* sp.,
recurso genético potencial de zonas áridas y semiáridas. "

015007

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

P R E S E N T A:

ELIZABETH ARRIAGA DIAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MEXICO, D. F.

2000



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.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Rubluo Islas. Con el apoyo del Comité de Becas-Crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos

Director de tesis:

Dr. Abraham Rubluo Islas

Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales. Jardín Botánico. IBUNAM

Sinodales:

Dra. Margarita Collazo Ortega.

Div. De Estudios de Posgrado. Fac. de Ciencias. UNAM

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Lab. de Microscopía Electrónica. Fac. de Ciencias. UNAM.

Dr. Victor Manuel Chávez Avila.

Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales. Jardín Botánico. IBUNAM.

Dra. Patricia Castillo España.

Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM.

Dra. Clara Esquivel Huesca.

Lab. de Biología del Desarrollo de las Plantas. Fac. de Ciencias. UNAM.

Dra. Cristina Pérez Amador.

Lab. de Química. Fac. de Ciencias. UNAM.

Al Biól. Agustín Vargas por el asesoramiento estadístico.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico. IBUNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto 27759 B.

A mi Familia con amor

Especialmente a mis queridos padres Virginia y Victor,
a mi esposo Fernando Antonio con cariño
y a mi adorado hijo
Diego Armando

No tengo palabras para agradecerles su apoyo

ABREVIATURAS

ANA Ácido Naftalenacético

AIA Ácido Indolacético

BAP 6- Bencilaminopurina

IBA Ácido Indolbutírico

Kin Kinetina 6-furfurilaminopurina

MS Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

INDICE

	Pag
1.RESUMEN	1
2.INTRODUCCIÓN	2
2.1. Situación actual de las zonas áridas	3
2.2. Beneficios del mejor conocimiento y aprovechamiento de las zonas áridas	4
2.3. Importancia de las especies multipropósito	5
2.4. <i>Prosopis</i> sp	6
2.5. Clasificación Taxonómica	9
2.6. Importancia del género <i>Prosopis</i> (mezquite)	9
2.7. Importancia del género <i>Prosopis</i> (mezquite) en México	10
2.8. Algunos usos de <i>Prosopis</i>	11
2.9. Sistemas convencionales de propagación de <i>Prosopis</i>	16
2.10. Sistemas biotecnológicos de propagación	17
3.ANTECEDENTES	19
3.1. Micropropagación en especies leñosas	19
3.2. La micropropagación involucra tres estados	21
3.3. Factores y problemas que afectan la micropropagación	22
3.4. Micropropagación en <i>Prosopis</i>	25
3.5. Factores que afectan la micropropagación en <i>Prosopis in vitro</i>	26
4.JUSTIFICACION	29
5.OBJETIVOS	31
6.MATERIALES Y METODOS	32
6.1. Material vegetal	32
6.2. Germinación de semillas	32
6.3. Elección de explantes con mayor potencial morfogénico	35
6.4. Inducción y desarrollo de brotes	36
6.5. Individualización de brotes generados a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días	40
6.6. Secuencias de desarrollo en cotiledones con hipocótilo (explantes originales)	41
6.7. Enraizamiento	46
6.8. Trasplante a suelo	46
6.9. Análisis estadístico	47

7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1. Germinación	48
7.2. Tipo de explante con mayor potencial morfogénético	51
7.3. Inducción y desarrollo de brotes	55
7.4. Individualización y desarrollo de brotes originados a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días	61
7 5. Secuencias de desarrollo en explantes originales (cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días)	62
7.6. Enraizamiento	71
7 7. Trasplante a suelo	72
8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
9.BIBLIOGRAFÍA	80
10.APÉNDICE	91

1.RESUMEN

Prosopis es una leguminosa que crece en las zonas áridas y semiáridas del territorio nacional. Es un árbol o arbusto de aprovechamiento integral que desde la antigüedad constituye una fuente de obtención de diversos productos para el consumo humano y ganadero. Ecológicamente representa el refugio y alimento de la fauna silvestre, sirve de planta nodriza a numerosas especies de zonas desérticas, es indicadora de mantos freáticos, formadora de suelos y soporta condiciones extremas de salinidad.

La micropropagación es una técnica para la rápida multiplicación de genotipos sobre condiciones asépticas, no obstante hay que considerar que en general, las especies leñosas son difíciles de trabajar debido entre otros factores a la dificultad de su enraizamiento, a la oxidación de los explantes en cultivo o por la falta de aclimatización a condiciones *ex- vitro*. Todos estos factores dependen de las condiciones genéticas de los explantes o de factores medioambientales que propician respuestas morfogenéticas muy variables en la micropropagación.

El interés del estudio consistió en realizar ensayos utilizando las técnicas de micropropagación para evaluar las respuestas morfogenéticas de *Prosopis* sp en cultivo *in vitro*, con la finalidad de sentar las bases para un conocimiento de la problemática de la regeneración *in vitro* de ésta especie y la utilización futura de éste recurso genético de las zonas áridas y semiáridas.

Durante el desarrollo de esta investigación se logró la germinación *in vitro* de *Prosopis* sp, se determinó que los explantes con mayor potencial regenerativo fueron los cotiledones con hipocótilo y que los reguladores de crecimiento Kinetina/Ácido Naftalenacético en bajas concentraciones favorecieron tanto la multiplicación como el porcentaje de respuesta morfogenética de los brotes. El enraizamiento de los mismos se obtuvo con la adición de IBA al medio de cultivo.

2.INTRODUCCION

Alrededor de 25 millones de Km², es decir una quinta parte de la superficie de los continentes puede considerarse como zona árida. Este cálculo incluye más del 75% de Australia, cerca del 65% del continente Africano, un 30% de Eurasia y aproximadamente el 15% de América (Toledo y Ordóñez , 1993).

Las principales características de las zona áridas son la escaséz y la irregularidad de la precipitación pluvial. Salvo casos especiales, la humedad atmosférica y la nubosidad se mantienen bajas, el cielo casi siempre es despejado y la iluminación fuerte. La temperatura sufre oscilaciones diurnas y estacionales considerables. Los vientos suelen ser frecuentes e intensos. Las lluvias son habitualmente de tipo torrencial y los fenómenos de inundación no son raros (Rzedowsky, 1968)

La República Mexicana esta situada entre los 20 y 40 ° de latitud norte y como consecuencia una gran parte de nuestro país sufre de aridéz. Las zonas áridas y semiáridas comprenden la más extensa zona ecológica con una área casi igual a la mitad del territorio mexicano (Toledo y Ordóñez, 1993). Este hábitat incluye dos grandes zonas bioclimáticas: la zona árida definida por una precipitación anual de 40 mm o menos y de 8 a 12 meses secos y la zona semiárida con una precipitación entre 400 y 700 mm y 6 a 8 meses secos. Corresponden respectivamente a los tipos de climas Bs y Bw del sistema Kóeppen-García; y están distribuidos en más de 500 municipalidades en los principales estados del norte y centro de México con un rango cercano a 99 millones de ha. Esta zona alberga a mas de 20 tipos de arbustos desérticos y xerófiticos y una gran variedad de tierras de pastura

y vegetación halofítica. De los 99 millones de ha, 84 millones corresponden a 384 municipalidades típicamente áridas y semiáridas (Toledo y Ordóñez, 1993).

2.1.Situación actual de las zonas áridas

La productividad biótica de las zonas áridas, salvo contadas excepciones, es considerada entre las más pobres del mundo. Su agricultura de riego sólo es factible en una pequeñísima parte de su superficie. Su ganadería de tipo extensivo es raquítica y sufre periódicamente fuertes estragos por las sequías de duración irregular. Su explotación forestal es difícil y generalmente poco costeable debido a la lentitud del crecimiento y regeneración de las plantas. Aunado a esto, el uso inadecuado y a veces anárquico de la tierra provoca con frecuencia la desaparición innecesaria de la vegetación natural o bien la mantiene a niveles degradados. Por otro lado el exceso de población rural en relación con las escasas tierras laborables a su disposición y la falta de otras fuentes de trabajo son la causa de que muchos campesinos tengan que dedicarse a actividades que les proporcionan ingresos bajos, al mismo tiempo que deterioran profundamente los recursos naturales. Entre estas actividades destaca el aprovechamiento indebido de las plantas silvestres y el pastoreo mal organizado y orientado (Rzedowsky, 1968; Toledo y Ordóñez, 1993).

Para darnos una idea de las situación actual que prevalece en las zonas áridas y semiáridas de México, en el año 1980 las cabezas de ganado que se encontraban en esta "zona ecológica" sobrepasaron los 8 millones ,

ocupando un área estimada de 57 millones de ha (Toledo, 1988), lo que representa más de la mitad de la superficie que ocupan las zonas áridas. Lo mismo se puede decir de las actividades forestales de carácter extractivo que afectan enormes áreas, como la explotación de cientos de productos de plantas del desierto tales como candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*), guayule (*Parthenium argentatum*), jobjoba (*Simmondsia chinensis*), lechuguilla (*Agave lecheguilla* Torr.), mezquite (*Prosopis* sp) y otras especies (Toledo y Ordóñez, 1993).

2.2. Beneficios del mejor conocimiento y aprovechamiento de las zonas áridas

Los recursos naturales de las regiones áridas y semiáridas se cuentan entre los menos utilizados hasta ahora. En general su valor agrícola es muy escaso y el porcentaje de población que mantienen no guarda ninguna relación con su enorme extensión. Con los medios que actualmente existen a nuestro alcance no es fácil convertir las superficies áridas en vergeles y crear en ellas fuentes de riqueza. Sin embargo sí resulta factible aumentar en forma considerable su potencialidad y aprovechamiento realizando explotaciones planeadas, metódicas y permanentes basadas en el mejor conocimiento de sus condiciones, recursos y posibilidades.

En Australia, Asia Menor y Estados Unidos se está efectuando una exitosa explotación de plantas de áreas marginales, ya sea por la extensión del área de cultivos existentes, o por la domesticación de leguminosas arbóreas multipropósito o por la reforestación con especies altamente resistentes a

condiciones áridas. En estos lugares varias extensiones áridas y semiáridas se han transformado en elementos abastecedores de materias primas y productos importantes (Sandys-Winsch y Harris, 1991).

Tales resultados son consecuencia de grandes esfuerzos encaminados hacia el mejor conocimiento de los recursos naturales de estas zonas, así como hacia la elaboración y aplicación de procedimientos adecuados de aprovechamiento y hacia el mejoramiento artificial de estos recursos. No hay razón por la cual las zonas áridas y semiáridas de México no puedan mejorar de la misma manera su economía, con el objeto de aliviar un poco las condiciones de extrema pobreza que sufren sus moradores y de crear medios de existencia para nuevos núcleos de población. Esto podría a su vez ayudar a resolver el problema de sobrepoblación en otras regiones del país (Rzedowsky, 1968).

2.3.Importancia de las especies multipropósito

Hay una considerable incertidumbre en la proyección de la población mundial, la cual probablemente se incrementará cerca de 1000 millones por década en los próximos 20 o 30 años, principalmente en las naciones con menos desarrollo (Fischer y Heilig., 1997). Un incremento en la población significa un incremento en la demanda de productos de todo tipo. Deberá realizarse un esfuerzo concertado para desarrollar métodos para la propagación masiva y la producción de árboles con un rápido crecimiento e incremento en el volumen de biomasa, así como aprovechar la variabilidad genética para la producción de especies frutales y forestales que sean

altamente productivas, resistentes a pestes y enfermedades y que exhiban un incremento en la eficiencia fotosintética.

Es importante enfatizar que debido a la crisis energética se deberán realizar esfuerzos para buscar fuentes de energía alternativas que sean utilizadas paralelamente a las convencionales. La conversión de energía solar por el incremento en la producción de biomasa, especialmente como leña, es considerada un promisorio origen de bioenergía. Cerca del 15% del combustible anual del mundo proviene de biomasa, y la madera es un gran origen de combustible energético (Ahuja, 1991).

Solamente una pequeña proporción de especies potencialmente útiles han sido introducidas en programas de reforestación pero existen otras plantas, especialmente arbóreas, que se han utilizado pero no se han domesticado o mejorado y permanecen como plantas silvestres. Por esto es necesario fijar la atención en leguminosas arbóreas multipropósito, especialmente aquellas con potencial para zonas áridas y semiáridas.

Científicos con una enriquecedora visión predicen que los géneros *Prosopis* y *Acacia* tendrán un mayor impacto en la sobrevivencia del hombre. Las especies de *Prosopis* son sobresalientes en su adaptación a ambientes áridos y semiáridos y el hombre lo ha utilizado desde tiempos prehistoricos para satisfacer sus necesidades (Tewari *et al.*, 1993b).

2.4. Prosopis sp.

El género *Prosopis* L., comunmente llamado mezquite, ha llamado la atención de los fitogeógrafos en virtud de las disyunciones que presentan

sus áreas de distribución. Sin embargo, hay una gran dificultad para definir correctamente la taxonomía del grupo y para esclarecer su filogenia porque la mayor parte de las especies son morfológicamente variables, a menudo se asemejan unas con otras y la introgresión génica parece ser un fenómeno común. Todo ello aunado a las modificaciones originadas por el hombre ofrece una realidad particularmente compleja (Rzedowsky, 1988).

De acuerdo con Burkart (1976), se trata de un grupo más bien primitivo de las Mimosoideae, probablemente originado en África tropical, donde persiste todavía un representante, la menos especializada y más mesófila *Prosopis africana* (Guill & al.) Taubert, único miembro de la sección *Anonychium*. Se conocen tres especies más en el antiguo mundo, en conjunto formando la sección *Prosopis* y habitando en las zonas áridas desde el norte de África hasta el Cáucaso y la India.

En América pueden distinguirse 4 líneas evolutivas y sus miembros muestran una preferencia evidente por los climas áridos. Por el número de sus componentes sobresalen dos secciones grandes: *Strombocarpa* con 9 especies y *Algarobia* con 30 especies. Además la sección *Monilicarpa* da cabida a una especie, mientras que el género segregado *Prosopidastrum* incluye dos.

Del total de las 42 especies conocidas de este continente, 29 existen en Argentina, principal centro de diversidad genética de *Prosopis*, siendo 14 de ellas endémicas. Diez especies se conocen en Norteamérica las cuales son: de la sección *Strombocarpa*: *P. palmeri* s. Wats; *P. reptans* var. *cinerascens* (A. Gray) y *P. pubescens* Benth. La sección *Algarobia* comprende 6 especies en Norteamérica (*P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina* S. Wats, *P.*

laevigata (Hummb. & Bonpl. ex Wild), *P. juliflora* (Sw.) DC. y *P. glandulosa* Torr.), pero cabe enfatizar el hecho que mientras varios autores reconocen para el conjunto sólo una especie variable, otros consideran hasta 14.

Finalmente, *Prosopidastrum*, una entidad recientemente separada por Burkart a nivel genérico, incluye en Norteamérica una sola especie *P. mexicanum* (Dressler) (Burkart, 1976)

En México se ubican varias de las especies de *Prosopis* y están localizadas desde los estados del norte y centro del país hasta la zona sur del estado de Oaxaca. El mezquite es una especie de importancia trascendental en las zonas áridas de Baja California (que cubren aproximadamente el 90% de su superficie) puesto que es una de las pocas formas arbóreas clave para la estabilidad y conservación de la biodiversidad de estos ecosistemas (Castellón, 1996).

2.5. Clasificación Taxonómica

Phylum: Spermatophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Serie: Apetaleae

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Prosopis*

2.6. Importancia del género *Prosopis* (mezquite)

Los mezquites y especies afines son árboles o arbustos esencialmente termo-xerófilos de considerable interés para el hombre. Son abundantes en muchas regiones áridas de América y con frecuencia constituyen el único elemento arbóreo de la vegetación. Entre otras cosas, proporcionan combustible y material para construcción, ofrecen sombra y alimento para los humanos y para sus animales domésticos.

Los mezquites eran muy importantes para muchas comunidades indígenas de este continente. Las áreas de distribución de algunas especies han resultado conspicuamente extendidas, debido a que estos árboles a menudo se cultivan a cientos y aun a miles de kilómetros de distancia de las localidades de donde provienen.

Estas especies han estado sujetas a controversia a través del mundo por ambientalistas, activistas sociales, agricultores, políticos y científicos debido a que algunos mezquites se caracterizan por su comportamiento agresivo y tienden a ocupar agostaderos y a veces también tierras de cultivo, reduciendo su valor (Villanueva, 1993).

2.7.Importancia del género *Prosopis* (mezquite) en

México

El mezquite tiene una amplia distribución en México; se le puede localizar desde el nivel del mar, hasta altitudes superiores a los 2000 m snm. Aunque se encuentra preferentemente en lugares moderadamente secos, prospera bien en climas Bw, hasta el Cw. Asimismo se distribuye en suelos de origen calizo a ígneo (Villanueva, 1993) .

Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones. Han estado ligados con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos, pero hasta la fecha no se han realizado estudios para su conservación y aprovechamiento (Villanueva, 1993).

En épocas pasadas los bosques de mezquites o mezquiales ocupaban amplias extensiones del país, pero han disminuido considerablemente debido al aprovechamiento intensivo de la especie y a la apertura de nuevas áreas para el cultivo. Estas acciones dan paso a posteriores áreas improductivas, dado que las condiciones climatológicas prevaecientes no son aptas para obtener a través de los cultivos tradicionales producciones

satisfactorias y mucho menos remunerativas, por lo que posteriormente estas áreas son abandonadas, requiriéndose un lento proceso para volver a su condición original (Villanueva, 1993).

2.8. Algunos usos de *Prosopis*

En México el mezquite se utiliza en diferentes regiones del país como son: Baja California, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Puebla y Oaxaca. Los usos más comunes en todas estas regiones son los siguientes:

Alimentación humana:

Las vainas se consumen generalmente como dulces, cuando estas se dejan secar y se machacan se comen como pinole y al remojarlas en agua se prepara atole (Emes, 1994).

Alimentación animal:

Las vainas se utilizan como forraje para el ganado caprino, porcino y equino (Emes, 1994).

Usos medicinales:

Las hojas se hierven y el agua se utiliza para lavar los ojos con la finalidad de curar infecciones y cataratas, también se utiliza como vomitivo y purgante.

La corteza del tronco hervida se utiliza para aliviar cólicos y atenuar el efecto de las toxinas de las picaduras de insectos con ponzoña. Las ramitas verdes se utilizan para bajar la fiebre y desvanecer hematomas (Emes, 1994).

Otros usos:

El tronco generalmente se utiliza para hacer vigas, armazones de camas, rayos de carretas, postes, muebles, arados y para la construcción de casas.

De la raíz se tejen hilos semejantes a los del ixtle. De la goma que exuda el tronco se curten pieles (Castellón, 1996).

En la India *Prosopis* es un género de gran interés y han sido explotados localmente por siglos, incluso *P. Cineraria* es un componente vital en sistemas agroforestales tradicionales, esto ha resultado en la generación de múltiples trabajos de investigación en esta leguminosa. Los usos más frecuentes que se le dan en este país se enumeran a continuación.

Alimentación humana:

Las vainas son utilizadas como alimento humano. Saunders y col. (1986) describieron que 1.000 kg de vainas secas molidas producen una elevada fracción de fibras, de proteínas, de azúcar y una fracción de goma de galactomanano. Estos autores también describieron su utilización para la elaboración de tortillas hindúes, galletas, hojuelas y panes de levadura. Por otro lado, se ha encontrado que la harina preparada del mesocarpo de las vainas presenta un agradable aroma y es igual a la harina de trigo. Cuando la harina de trigo es sustituida por la de *Prosopis* sólo se utiliza un tercio de ésta (Felker, 1993).

Alimentación animal:

Las semillas y las vainas son un buen alimento para el ganado caprino. La producción promedio de vainas de *Prosopis juliflora* (Swartz) DC por árbol en la región de Ganhinagar, India, anualmente es de 18.95 Kg. La composición química de las vainas varía durante las estaciones de invierno y verano, contienen un 13% de proteína y un 40% de azúcar. Las posibilidades del

mejoramiento genético en calidad y la producción de vainas son excelentes debido a las enormes variaciones de estos factores (Kanznia y Varshney, 1993).

Leña:

La demanda mundial de madera en 1985 fue de 260 millones de toneladas métricas, en 1970 fueron requeridas 130 millones de toneladas métricas; este drástico incremento es debido a la utilización de la madera como combustible. La terrible deforestación y la industrialización han provocado una tremenda erosión del suelo y la formación de suelos estériles. Así, el reto a enfrentar es el tener alternativas que permitan producir árboles de rápido crecimiento que se puedan propagar y multiplicar en cortos periodos y que puedan generar grandes cantidades de biomasa (Kanznia y Varshney, 1993).

Existen muchos reportes de *Prosopis* sobre la producción de biomasa por unidad de área, pero los resultados varían considerablemente en diferentes regiones. Un estudio llevado a cabo por el instituto de investigación en Ganhinagar, India, encontró que la biomasa de materia seca utilizable (tronco y ramas) de *Prosopis juliflora* (Swartz) DC fue de 133 t/ha, en una plantación de 4 años. La madera es dura con una gravedad específica de 0.7, por lo que se quema lentamente. El valor calórico de la leña es de 4.800 Kcal/Kg (Kanznia y Varshney, 1993).

Carbón vegetal:

El promedio en la producción de leña en Ganhinagar, India, es de aproximadamente de 30 t/ha al año de materia seca, la cual, si es convertida en carbón puede producir aproximadamente 10 toneladas de carbón vegetal (Kanznia y Varshney, 1993).

Gasificación:

Se ha encontrado que *Prosopis* es ideal para utilizarse como generadora de energía. El requerimiento de combustible para generar 150 MW de energía se estima que se encuentra entre los 0.6-0.7 millones de toneladas al año de madera seca de *Prosopis*. La tecnología de gasificación esta avanzando rápidamente, la cual podría hacer posible el uso de este abundante recurso natural (Kanznia y Varshney, 1993).

Madera:

El uso de la madera es limitado por la pequeña talla de los árboles, pero puede ser un excelente sustituto de madera mas costosa. *Prosopis* es mucho más valiosa cuando se convierte en madera dimensional, ya que tiene una estabilidad dimensional excepcional con resistencia a cambios de condiciones de humedad, además tiene una dureza y densidad similares al roble y otras maderas tropicales duras; adicionalmente tiene un atractivo color y figura.

La madera es utilizada de acuerdo a la región; en la India se usa para construir casas y para manufacturar implementos agrícolas.

Miel:

Los árboles de *Prosopis juliflora* (Swartz.) DC florecen dos veces al año, y el néctar de sus flores es muy bueno como alimento de abejas. La producción aproximada al año en Kutch, India (en donde existen densas plantaciones de esta especie, con tecnología de vanguardia en la apicultura) es de 300 toneladas por año (Kanznia y Varshney, 1993).

Goma:

La corteza exuda una goma soluble en agua caliente que se utiliza en la industria para la obtención de metanol (Kanznia y Varshney, 1993).

Mejoramiento de suelos:

Cuando se cultiva en suelos salinos se ha observado que las raíces absorben sales y las preservan en el tallo y de esta manera reducen la concentración de sales en el suelo. Las hojas caídas en descomposición también incrementan el proceso de recuperación del suelo. Adicionalmente son especies fijadoras de nitrógeno (Dagar, 1993).

Importancia ecológica:

Por proveer una cubierta vegetal también reducen la erosión y sirven de especies nodriza a otras especies del desierto, además son estabilizadoras de dunas costeras (Castellón, 1996).

Otros usos:

Se han encontrado numerosos compuestos en *P. juliflora* como esteroides, taninos y leucoantocianidina. La investigación química ha permitido que de las partes cerosas de las agallas de la planta se extraiga el triacontanol, el cual es efectivo en el crecimiento y la absorción de agua de las raíces de las

plántulas de arroz; también promueve el crecimiento y la germinación en maíz y cebada (Khan, 1993).

Aplicaciones a nivel industrial en otros países:

Ejemplos de aplicaciones en donde han tenido lugar desarrollos innovadores son una empresa para la crianza de ovejas en el desierto de Atacama de Chile usando *P. Tamarugo (Phil)*. Procesando las vainas de *P. juliflora* como alimento para animales a pequeña escala comercial en Brasil y controlando la erosión en Cabo Verde con *P. juliflora*. En Argentina se utiliza en la fabricación de parquet. Otras técnicas se están implementando en Estados Unidos y Sudamérica para utilizar las semillas y las vainas para consumo humano en bebidas y botanas. El mejoramiento en la explotación de *Prosopis* para elaborar productos de madera de calidad ha permitido reanudar el interés de estos géneros en Estados Unidos (Felker, 1993).

2.9.Sistemas convencionales de propagación de *Prosopis*

Los frutos del género *Prosopis* son indehiscentes y sus semillas presentan latencia. Los programas de reforestación se han basado tradicionalmente en el uso de semillas, ello corresponde a una estrategia adecuada en regiones donde factores abióticos y/o bióticos implican un gran riesgo.

Dado que en el género existe autoincompatibilidad, se provocan cruzamientos interespecíficos con facilidad, las semillas derivadas de la polinización cruzada pueden generar individuos de extrema variabilidad en relación a las plantas madre (Jordan, 1987b). Sólo a través de la

propagación asexual es posible la multiplicación y utilización de selecciones o clones de mejor calidad, preservando las características deseadas.

Se han utilizado diferentes técnicas de propagación vegetativa dependiendo de la potencialidad morfogénica de los explantes; la utilización de tallos subterráneos, acodos aéreos y brotes basales o subterráneos (tocones) han dado resultado; sin embargo, existen grandes diferencias en la respuesta que son atribuibles a características particulares de cada genotipo (Jordan, 1987b).

2.10. Sistemas biotecnológicos de propagación

Los sistemas biotecnológicos de propagación a través del cultivo *in vitro* representan una opción interesante para desarrollar técnicas de propagación vegetativa para clonar individuos de calidad superior de las especies pertenecientes al género *Prosopis*.

El cultivo *in vitro* comprende un amplio rango de metodologías que involucran el aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca, 1991).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el potencial para regenerar una planta completa a partir de una célula (concepto de totipotencialidad de Haberlandt en 1902), pero no fue hasta los años cincuenta que una planta fue regenerada de cultivos de células aisladas. A partir de esta fecha el

campo de cultivo de tejidos, células y órganos ha tenido un gran desarrollo (Wilkins y Dodds, 1983).

Las técnicas de cultivo de tejidos pueden ser agrupadas en:

- cultivo de órganos (meristemas, ápices, embriones, ovarios, etc.)
- cultivos en suspensión
- cultivos de células individuales y protoplastos
- cultivos de anteras y polen

3. ANTECEDENTES

3.1. Micropropagación en especies leñosas

Durante la década de los años 70, la producción comercial de especies leñosas por las técnicas de cultivo de tejidos progresó rápidamente. La magnitud de este cambio es verdaderamente remarcable, tanto en el número de plantas producidas como en la cantidad de especies propagadas. En el año 1978 comenzó la producción comercial de algunas plantas leñosas como manzanos y duraznos en Europa. En los años 1979 y 1980 el interés por utilizar comercialmente las técnicas de cultivo se incrementó y desde entonces la producción se ha expandido incluyendo numerosas especies y cultivares, de las cuales al menos 60 géneros son de plantas ornamentales, forestales y frutales (Zimmerman, 1985).

En la actualidad la biotecnología aplicada a especies leñosas forestales y frutales implica no solamente la multiplicación rápida y masiva de bancos de germoplasma para la producción de biomasa leñosa, también la conservación de importantes especies y genotipos élite o raros, las cuales están amenazadas de extinción, debido a la rápida deforestación y agotamiento de bancos genéticos. Los métodos *in vitro* se han refinado hasta el punto de obtener árboles libres de enfermedades que pueden ser obtenidos de células y tejidos, propagados masivamente y transferidos a huertos y bosques.

Observando el progreso que se ha realizado en la última década en esta área del cultivo de tejidos, se ha encontrado que tiene el potencial

biotecnológico no sólo desde el punto de vista básico y fundamental sino que ofrece aplicaciones directas para el mejoramiento de árboles y el incremento en la producción de biomasa. Dichas aplicaciones son:

- 1.- Producción de energía a través de la producción de biomasa
- 2.- Plantas libres ó resistentes a enfermedades
- 3.- Inducción y selección de mutantes
- 4.- Producción de haploides a través de cultivo de anteras
- 5.- Amplia hibridización a través del cultivo de óvulos y embriones
- 6.- Híbridos somáticos a través de fusión de protoplastos
- 7 - Obtención de organismos transgénicos
- 8.- Fijación de Nitrógeno
- 9.- Mejoramiento en la eficiencia fotosintética
- 10.- Criopreservación de individuos y/o tejidos con cambios genéticos

A través de la utilización de las técnicas *in vitro* un árbol deseado, seleccionado sobre las bases mencionadas, puede ser propagado vegetativamente y clonado rápidamente; mientras que su propagación y cultivo mediante los métodos convencionales de estacas, injertos y otras prácticas silvícolas y hortícolas puede tomar años. Esta tecnología ha sido exitosamente aplicada en numerosas especies frutales y forestales tales como *Pinus* (pinos), *Eucalyptus* (eucaliptos), *Malus pumila* Mill.(manzanos), *Spondias mombin* L. (ciruelos) etc. (Bajaj, 1986).

3.2. La micropropagación involucra tres estados:

- a) Establecimiento del cultivo
- b) Regeneración de plantas
- c) Transferencia de plantas del laboratorio a suelo

La regeneración de plantas puede ser (1) directa de explantes tales como segmentos nodales, yemas, meristemos, etc, o (2) indirecta, vía iniciación y diferenciación de callo, suspensiones celulares o protoplastos.

(1) La regeneración directa de plántulas o la formación de embriones somáticos (*desarrollo de embriones de células somáticas*), de explantes tales como yemas, meristemos, estacas, etc. asegura la clonación de los bancos genéticos. El cultivo de embriones ha sido empleado como una herramienta útil para la regeneración directa en árboles donde las semillas son recalcitrantes, se encuentran en dormancia o donde son abortadas en etapas tempranas del desarrollo.

(2) En contraste al método directo el cual asegura la estabilidad clonal, la regeneración de plantas a través de callo, suspensiones celulares y protoplastos puede resultar en variabilidad genética debido a que durante el subcultivo continuo se pueden presentar alteraciones de tipo genético como mutaciones, cambios en ploidías, etc. La ventaja del cultivo de callo es el enorme número de plantas que pueden ser producidas de un simple cultivo, ya que cada célula es una planta potencial. El cultivo de callo puede ser

utilizado cuando es importante la cantidad y no la calidad del producto o bien cuando resulta de interés generar variantes genéticos (Bajaj, 1986).

3.3. Factores y problemas que afectan la micropropagación

El éxito de los programas de micropropagación depende de numerosos factores, tales como el tipo y origen del explante, el método de esterilización, el medio y condiciones de cultivo.

Los problemas encontrados a menudo son la oxidación de los tejidos, la vitrificación, la no inducción de enraizamiento, dificultad de aclimatización y mortalidad en la transferencia a suelo.

1. Origen y naturaleza del explante.- La edad, naturaleza, y el estado fisiológico del explante, así como la variación estacional juegan un papel crucial en el establecimiento de los cultivos y en la subsecuente regeneración de plantas. Los explantes de árboles jóvenes y explantes juveniles son más fáciles de responder al cultivo *in vitro* que árboles maduros o viejos (las estacas tomadas de plantas jóvenes generalmente exhiben un potencial de enraizamiento el cual desaparece cuando las plantas han alcanzado la edad adulta). Algunos ejemplos de la regeneración de árboles de 100 años son el de *Sequoia sempervirens* y *Tectonia grandis* (Cachitá-Cosma, 1991).

La mejor respuesta rizogénica de material juvenil ha sido atribuida a varias causas, como son el contenido de auxinas el cual es más importante en

brotos juveniles o la presencia de co-factores lipídicos de enraizamiento que da mayor habilidad de enraizamiento también en formas juveniles (Bajaj, 1991).

2. Oxidación de los explantes.- La oxidación de los explantes inmediatamente después de la inoculación ha sido un serio problema, especialmente con las especies leñosas. Esto se ha atribuido a la presencia de compuestos fenólicos y a taninos en los tejidos. Este problema puede ser superado utilizando antioxidantes como ácido Ascórbico, Carbón activado, PVP, Cisteína, incubación en oscuridad o frecuentes transferencias a medio fresco (Bajaj, 1991).

3. Medio y Reguladores de Crecimiento.- Se han empleado varios medios basales pero el medio MS (Murashige-Skoog, 1962) con modificaciones menores, suplementado con vitaminas y sacarosa es el más utilizado. Este medio es de alta salinidad y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos, sin embargo debido a la elevada concentración de algunas sales minerales que lo componen en ciertas etapas del cultivo su concentración se reduce a la mitad (Roca, 1991).

La vía de diferenciación (organogénesis, embriogénesis y rizogénesis) es controlada por reguladores de crecimiento como las auxinas, citocininas y giberelinas. Las auxinas incluyen una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir alargamiento y crecimiento celular y al mismo tiempo promover la división celular. La misma célula o estructura puede exhibir respuestas opuestas dependiendo de la concentración,

cuando las concentraciones de auxinas son elevadas generalmente se induce callo (Roca, 1991).

Las citocininas estimulan la división celular y están involucradas en un amplio rango de respuestas, como es el impedir la senilidad de los tejidos que empiezan a envejecer o promover la formación de brotes (Bajaj, 1991).

Las giberelinas como el ácido Giberélico son capaces de intervenir en el crecimiento de las plantas ocasionando un alargamiento celular (Roca, 1991).

4. Vitrificación.- La vitrificación es un serio problema en la micropropagación. Este término se utiliza generalmente para caracterizar malformaciones hiperhídricas. Las plantas vitrificadas permanecen turgentes, con una apariencia acuosa e hipolignificadas, translúcidas, menos verdes y se rompen fácilmente (en la pared celular de las plantas vitrificadas se ha reducido la deposición de celulosa y lignina lo cual reduce su resistencia a la presión). Las hojas son delgadas con grandes espacios intracelulares. La vitrificación es causada aparentemente por la acumulación de etileno y la elevada concentración de iones de calcio y amonio en el medio de cultivo. Se cree que las citocininas también estén implicadas. La vitrificación ocurre en mayor grado durante una intensa multiplicación (Ziv, 1991).

5. Inducción de Enraizamiento y Aclimatización.- Algunas veces hay un elevado índice de mortalidad por la falta de inducción de enraizamiento de los brotes *in vitro* o debido a subsecuentes problemas de aclimatización. Varios factores afectan la rizogénesis adventicia. Para inducir el enraizamiento de estacas a menudo se hacen crecer asépticamente en un

medio conteniendo auxinas tales como IAA, IBA, o ANA. Sin embargo esta práctica puede evitarse insertando directamente los brotes en arena. Este método se ha utilizado exitosamente en especies como *Ficus*, *Tectona*, *Solanum tuberosum*, etc.

La gran pérdida de plantas *in vitro* durante su transferencia a suelo, ha estimulado una considerable investigación sobre aclimatización. El incremento en el índice de sobrevivencia de plantas ha sido por el uso de antitranspirantes, coberturas que permiten una elevada concentración de humedad, luz suplementaria y enriquecimiento con CO₂ (Kozai, 1991).

3.4. Micropropagación en *Prosopis*

Se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar una técnica de micropropagación en *Prosopis* en más de 10 años de investigación y solamente se ha obtenido un éxito limitado. Uno de los logros es la micropropagación de ápices de brotes en algunas especies, pero no se ha obtenido aún una propagación rápida y sostenida.

Se ha reportado la regeneración de plantas completas a través del cultivo de ápices de brotes en *P. alba* (Jordan *et al.*, 1985, 1987b; Walton *et al.*, 1990), *P. chilensis* (Batchelor, 1989; Arce y Balboa, 1991; Walton *et al.*, 1990), *P. cineraria* y *P. glandulosa* (Walton *et al.*, 1990).

La regeneración de explantes nodales se ha obtenido en *P. alata* (Arce y Balboa, 1991), *P. cineraria* (Goyal y Arya, 1984; Arya y Shekhawat, 1986), *P. juliflora* (Batchelor *et al.*, 1989; Yao *et al.*, 1989; Nandwani y Ramawat, 1991), *P. tamarugo* (Jordan y Balboa, 1985; Jordan, 1987a).

Meier y Bovo (1995) reportaron el desarrollo de yemas axilares a partir de estacas nodales de *P. alba*, así como callo en la base de las estacas.

La formación de brotes múltiples se ha logrado en nodos de *P. alba* (Tabone *et al.*, 1986). Batchelor (1989), reportó brotación múltiple en cultivos nodales de *P. chilensis*. Arya y Shekhawat (1986) obtuvieron brotación múltiple en yemas axilares y terminales de *P. cineraria* después de 110 días de cultivo.

Se han realizado pocos intentos para regenerar plantas de *Prosopis* a partir de cultivos de callo o de protoplastos. Nandwani y Ramawat (1991) observaron la formación de callo en varios explantes de *P. juliflora*. Jordan y col. (1987a) cultivaron callo de *P. chilensis* y *P. tamarugo*.

Desafortunadamente parece ser que *Prosopis* es mucho menos manipulable biotecnológicamente que otras especies de leguminosas. La dificultad en la micropropagación en *Prosopis* ha estimulado la investigación básica sobre la nutrición de plantas en cultivo, los problemas en la absorción de nutrientes ha sido una de las principales razones de su estudio.

3.5. Factores que afectan la regeneración de plantas de *Prosopis in*

vitro

Muchos de los factores que afectan la producción de plantas completas *in vitro* son aquellos en los que se ha demostrado la influencia del enraizamiento en estacas convencionales.

Las especies de éste género responden diferente a las mismas condiciones de cultivo. Por ejemplo Walton y col. en 1990, obtuvieron diferentes porcentajes de regeneración de plantas a partir de ápices de brotes en *P.*

glandulosa (100%), *P. alba* (94%), *P. Juliflora* (74%), *P. chilensis* (67%), *P. cineraria* (9%) y *P. tamarugo* (4%). Jordan y Balboa en 1985 y Jordan y col. en 1987 obtuvieron 14% y 43% de regeneración de plantas completas a partir de explantes nodales, la respuesta en el enraizamiento fue siempre mejor en *P. chilensis* que en *P. tamarugo* sobre las mismas condiciones de cultivo.

Jordan (1987b) intentó determinar si la variación de fenoles puede explicar las diferencias en la capacidad regenerativa entre especies ya que regeneró plantas completas a partir de ápices de brotes de *P. alba* y *P. chilensis* pero no de *P. tamarugo*, debido a que fueron severamente afectados por la oxidación de los tejidos.

Al igual que las estacas de tallo convencionales, la edad de la planta de la que los explantes son tomados puede influir en el éxito de la regeneración *in vitro*. Arce y Balboa en 1991, obtuvieron un 80% de regeneración de segmentos nodales y apicales de material juvenil de 1-4 meses de edad creciendo en macetas, comparado con un 60% en material del campo. Walton y col. (1990) reportaron una declinación del enraizamiento *in vitro* de ápices de brotes de *P. tamarugo* con la edad, obteniendo un 81% en plántulas de 4 semanas en comparación con un 42% con plántulas de 20 semanas.

Parece probable que existan diferencias en los requerimientos hormonales y nutricionales en el medio de acuerdo a la especie: Goyal y Arya (1984) evaluaron el efecto de varios azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y

dextrosa) sobre el crecimiento de *P. cineraria* y encontraron que una concentración de 30 g/l de sacarosa dio un óptimo resultado.

Jordan (1987b) mostró que la formación de plántulas y de raíces a partir de nodos de *P. tamarugo* y *P. alba* fue mayor a 25 y 30°C, esto implica una posible influencia de la temperatura sobre el enraizamiento.

Muy pocos reportes de la propagación *in vitro* han incluido estudios comparativos de los efectos de factores medioambientales. Batchelor (1989) no encontró diferencias entre una elevada intensidad luminosa (100 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$) y una baja intensidad (7-24 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$) en cultivos de ápices de brotes en *P. chilensis*, mientras que *P. juliflora* mostró un ligero incremento en su crecimiento con una elevada intensidad luminosa.

4.JUSTIFICACIÓN

El incremento de la población humana y por tanto el consumo de energía por habitante ha resultado en una sobreexplotación de los recursos naturales. Los círculos viciosos de sequía e inundación visibles en muchas partes del mundo son probablemente un reflejo del rompimiento del balance en la naturaleza debido a la destrucción indiscriminada de la vegetación. Actualmente se visualiza que para la sobrevivencia de la raza humana es vital proteger los ecosistemas que permanecen y librarlos de futuros daños generando tecnologías de vanguardia con criterios de sostenibilidad que permitan utilizar los recursos para satisfacer las demandas de materias primas y a la vez se restauren y conserven los ecosistemas contribuyendo así a un desarrollo sostenido.

Por su rápido crecimiento, la robustez y dureza de sus troncos, las leguminosas arbóreas (que enriquecen el suelo con bio-fertilizantes nitrogenados) son las primeras candidatas para repoblar vastos desiertos. Las especies fijadoras de nitrógeno no solamente sobreviven sobre severas condiciones, también en un periodo de tiempo mejoran el estado nutricional del suelo, haciendolo favorable para otras especies. Muchas especies de leguminosas arbóreas multipropósito producen combustible, madera y forraje que son utilizados por humanos y animales. Estas han sido sobreexplotadas localmente pero no se les ha dado su valor real, sólo una pequeña parte de estas especies potencialmente útiles se han utilizado en programas de reforestación en Sudamérica, Asia y Estados Unidos.

La micropropagación es una técnica útil para la rápida multiplicación de genotipos sobre condiciones asépticas, no obstante hay que considerar que en general, las especies leñosas son difíciles de trabajar debido, entre otros factores, a la dificultad de su enraizamiento, a la oxidación de los explantes en el cultivo o a la falta de aclimatización a las condiciones *in vivo*. Todos estos factores dependen de las condiciones genéticas de los explantes o de factores medioambientales que propician respuestas morfogénicas muy variables en la micropropagación.

El interés del estudio consistió en realizar ensayos utilizando las técnicas de micropropagación para evaluar las respuestas morfogénicas de *Prosopis* sp en cultivo *in vitro*, con la finalidad de sentar las bases para un conocimiento de la problemática de la regeneración *in vitro* de esta especie y la utilización futura de éste recurso genético potencial en las zonas áridas.

5.OBJETIVOS

5 a) Objetivo General

Evaluar las respuestas morfogénicas de *Prosopis* sp en el cultivo *in vitro* con el propósito de establecer las bases para la elaboración futura de una metodología que permita la propagación masiva de individuos superiores seleccionados en campo.

5 b) Objetivos Particulares

- 1) Analizar el efecto de la escarificación térmica y química sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Prosopis* sp.
- 2) Determinar el tipo de explante con mayor potencial regenerativo.
- 3) Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la regeneración de brotes y el enraizamiento de *Prosopis* sp.
- 4) Obtener el desarrollo de plántulas completas *in vitro* y lograr su adaptación bajo condiciones de invernadero.

6.MATERIALES Y METODOS

6.1.Material vegetal

Plantas colectadas en el mes de octubre de una población silvestre localizada en San Matías, Baja California Norte, se determinaron taxonómicamente en el género *Prosopis* L., en el Herbario de la Universidad Autónoma de Baja California.

6.2.Germinación de semillas

Debido a que los frutos del género *Prosopis* son indehiscentes, con semillas en latencia, encerradas en un endocarpo y una cubierta seminal, las semillas fueron pretratadas con los métodos de escarificación térmica y química.

a) La escarificación térmica consistió en la inmersión de las semillas en agua destilada esterilizada a temperatura de ebullición durante 30 minutos y su posterior remojo durante 24 horas.

b) La escarificación química consistió en la inmersión de las semillas en ácido Clorhídrico concentrado o en ácido Sulfúrico concentrado.

Una vez que las semillas fueron escarificadas, se esterilizaron superficialmente, sometiéndolas a un proceso de desinfección con la finalidad de eliminar cualquier fuente de contaminación por microorganismos que se pudieran encontrar en las semillas (ya que la contaminación por microorganismos se considera una de las causas más importantes de pérdida de plantas durante el establecimiento del cultivo *in vitro*).

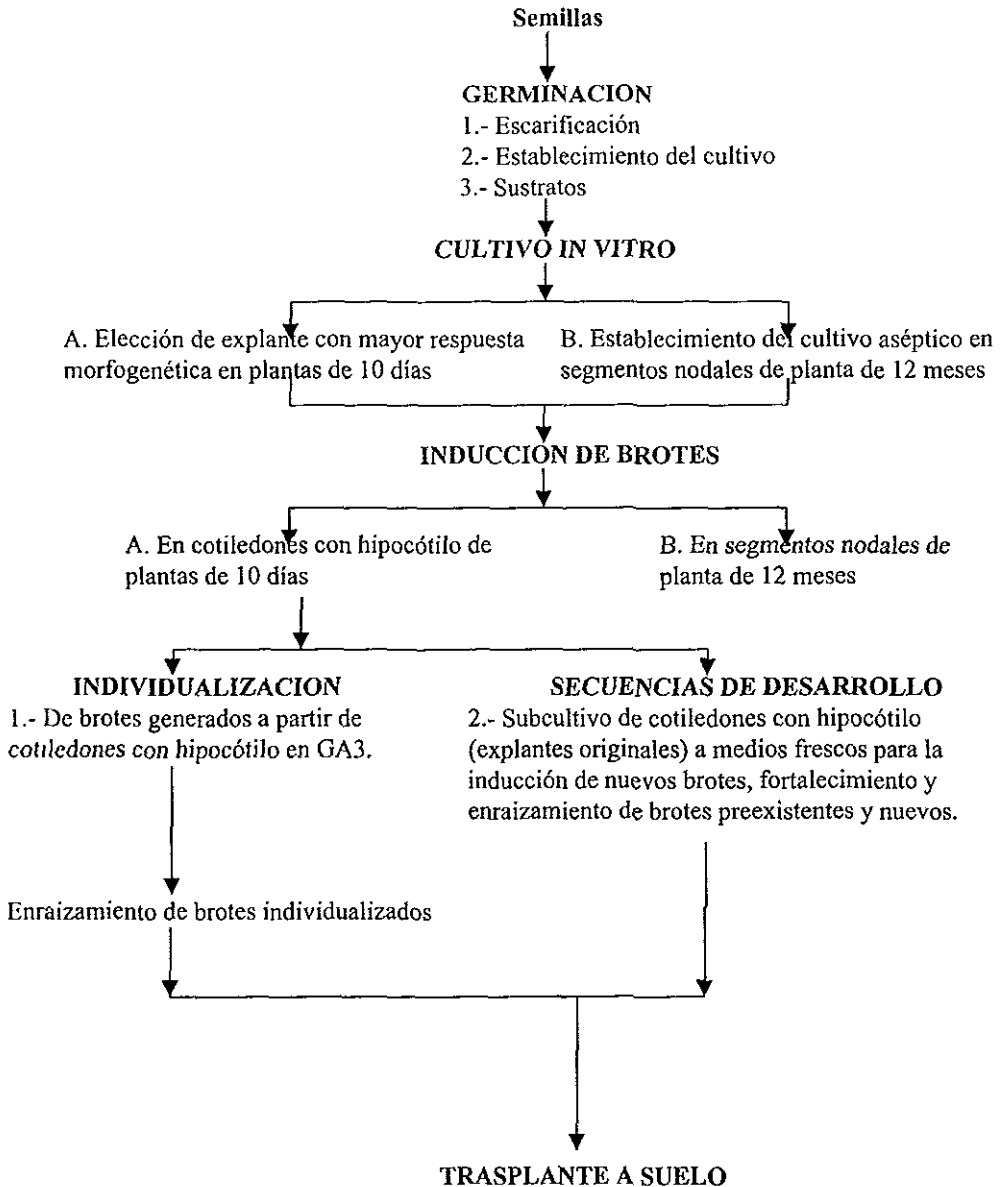
Para eliminar el exceso de ácido en la cubierta seminal, las semillas se enjuagaron vigorosamente en agua corriente durante tres minutos y subsecuentemente con agua destilada y detergente biológico tween 80 (tres por 100 ml⁻¹) durante dos minutos. Posteriormente se sumergieron en etanol al 70% durante un minuto, seguido por su inmersión en Hipoclorito de Sodio comercial (Cloralex) al 10% (v/v 6% de Cloro activo) en agitación constante por 10 minutos. Enseguida, bajo condiciones asépticas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada esterilizada.

Para la germinación de las semillas se utilizaron dos sustratos: germinadores con algodón humedecido con agua destilada esterilizada en frascos de cristal de 250 ml de capacidad y agar-agar al 0.8% adicionado con las sales del medio de cultivo de Murashige-Skoog (MS) (1962) modificado: macro y micronutrientes al 25%, con 1% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento. El pH del medio se ajustó a 5.6 antes de ser autoclaveado (20 lb/pulg²) durante 15 minutos a 121 ° C.

Fueron utilizadas en los experimentos doscientas cuarenta semillas maduras de aproximadamente 60 a 70 mg de peso cada una, subdivididas en 8 lotes de 30 semillas cada uno.

Las condiciones ambientales controladas utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes: fotoperiodo de 16 h provisto por lámparas de luz blanca fluorescente (2000 lux) a 26 ± 2° C.

Diagrama 1. Esquema general para la micropropagación de Prosopis sp.



6.3. Elección de explantes con mayor potencial morfogenético

En el Diagrama 1 se describe el proceso metodológico general de la micropropagación de *Prosopis* sp. incluyendo el cultivo de explantes somáticos hasta el trasplante a suelo de brotes enraizados.

A.- Explantes de plantas de 10 días:

Con la finalidad de elegir a los explantes con una mayor respuesta morfogenética (para ser utilizados en tratamientos subsecuentes) fueron disectados asépticamente tejidos cotiledonares de plantas de 10 días de germinadas. Se utilizaron como explantes 30 cotiledones unidos con 0.5 cm de hipocótilo, 30 cotiledones unidos sin hipocótilo, 30 cotiledones individualizados y 30 segmentos de hipocótilos con una longitud de 0.8 a 1.0 cm.

Tres explantes fueron sembrados por frasco de cultivo en el medio sólido MS, adicionado con los reguladores de crecimiento ANA y Kinetina en cinco tratamientos con las siguientes concentraciones 0/0; 0.1/0.01; 0.5/0.05; 0.01/0.1 y 1.0/0.05 mg/l respectivamente, también con la adición de antioxidantes ácido Ascórbico, ácido Cítrico y Cisteína en una concentración de 100 mg/l cada uno (concentración elegida con base en ensayos previos no reportados en este trabajo). Normalmente en los tratamientos de las especies de *Prosopis* se han incluido antioxidantes con la intención de controlar la oxidación en explantes y medio, lo cual se ha atribuido a la presencia de fenoles (Jordan, 1987b; Batchelor, 1990).

Para el registro de resultados, se dio seguimiento cada 8 días de los cultivos hasta completar 12 semanas *in vitro*

B.- Explantes de planta de 12 meses:

Veinte segmentos o estacas nodales de 1.0 cm de longitud provenientes de una planta de 12 meses de edad también fueron utilizados como explantes.

Las estacas nodales se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos, subsecuentemente se lavaron con agua y jabón comercial durante 10 minutos y enseguida se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto para su posterior inmersión en Hipoclorito de Sodio (Cloralex) al 20 % durante 20 minutos en agitación constante. Posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se sometieron a un tratamiento con fungicida Captán al 0.3% durante 30 minutos para ser lavados con agua destilada esterilizada dentro de una campana de flujo laminar y cultivados *in vitro* para inducir morfogénesis.

6.4.Inducción y desarrollo de brotes

a) En cotiledones con hipocótilo de plántulas de 10 días

Para el estudio del efecto de los reguladores de crecimiento Kin, BAP, AIA y ANA en la inducción y desarrollo de brotes, se sembraron cotiledones con hipocótilo (explante con mayor respuesta morfogénica) en frascos Gerber con capacidad de 120 ml conteniendo 25 ml de medio sólido de MS suplementado con agar-agar al 0.8 %, sacarosa 3% y los aditivos ácido Ascórbico, Cítrico y Cisteína en una concentración de 100 mg/l cada uno. En todos los casos el pH de los medios se ajustó a 5.6 con HCl ó NaOH 0.1 N.

El medio se distribuyó en frascos Gerber de 120 ml de capacidad, se agregaron 25 ml de medio de cultivo a cada frasco y se esterilizaron en una autoclave a 20 lb-pulg² de presión y 121 °C durante 15 minutos.

Las combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes a partir de cotiledones con hipocótilo fueron las siguientes:

a.- Treinta y seis explantes se sembraron en 6 tratamientos que contenían los reguladores de crecimiento BAP y AIA, 0/0; 0.01/0.10; 0.10/0.01; 0.50/0.05; 0.75/0; 1.0/0.5 mg/l respectivamente.

b.- Se sembraron doscientos cuarenta explantes en 15 tratamientos con concentraciones variables de BAP 0; 0.75; 1.0; 2.0; 5.0 en combinación con ANA 0; 0.1; 0.5 mg/l (Cuadro 1).

c.- En ANA en las concentraciones 0;0.1; 0.5; 0.01;1.0 mg/l en combinación con Kin 0.0; 0.01; 0.05; 0.1 mg/l se sembraron 300 explantes en 20 tratamientos (Cuadro 2).

d.- En ANA 0.1; 0.3; 0.5 mg/l y Kin 1.0; 3.0; 5.0 mg/l se sembraron 144 explantes en 9 tratamientos (Cuadro 3).

Cada experimento se repitió 4 veces con 4 explantes en cada frasco para obtener un total de 16 explantes por tratamiento con excepción de BAP/AIA en donde el número de explantes fue de 6 por tratamiento y de ANA en las concentraciones 0; 0.1; 0.5; 0.01;1.0 mg/l en combinación con Kin 0.0; 0.01; 0.05; 0.1 mg/l en donde se sembraron 15 explantes por tratamiento. Los resultados se registraron cada 8 días durante 3 meses.

Cuadro 1.- Combinación de los reguladores de crecimiento BAP y ANA a diferentes concentraciones. Se utilizó como medio basal el medio MS (1962).

Reguladores de crecimiento (mg/l)

BAP \ ANA	0	0.75	1.0	2.0	5.0
0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
0.5	11	12	13	14	15

Cuadro 2.- Combinación de ANA y Kin para la inducción de brotes en diferentes concentraciones. Se utilizó como medio basal el medio MS (1962).

Reguladores de crecimiento (mg/l)

ANA \ Kin	0	0.01	0.5	0.1	1.0
0	1	2	3	4	5
0.01	6	7	8	9	10
0.05	11	12	13	14	15
0.1	16	17	18	19	20

Cuadro 3.- Combinación de ANA y Kin en concentraciones mayores, para la inducción de brotes. Se utilizó como medio basal el medio MS (1962).

Reguladores de crecimiento		(mg/l)		
		ANA	0.1	0.3
Kin	1.0	1	2	3
	3.0	4	5	6
	5.0	7	8	9

b) En explantes de planta de 12 meses

Para la inducción de brotes, los 20 explantes nodales originados de tejidos de una planta de 12 meses ubicada en el invernadero se cultivaron sólo en una combinación de los reguladores de crecimiento: Kin 5 mg/l con ANA 0.1 mg/l. Se utilizó como medio basal MS adicionado con los aditivos Cisteína, ácido Ascórbico y ácido Cítrico en 100 mg/l cada uno. El medio se esterilizó en una autoclave a 20 lb·pulg² de presión y 121 °C durante 15 minutos. Se subcultivaron para su elongación y multiplicación en BAP 3 mg/l con Kin 0.1 mg/l. El registro de resultados se llevó a cabo diariamente durante 60 días de cultivo.

6.5. Individualización de brotes generados a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días

Los brotes generados *in vitro* a partir de cotiledones con hipocótilo se individualizaron y cortaron en segmentos de 0.5 cm, transfiriéndose posteriormente a diferentes medios para su elongación y multiplicación. Se ensayaron varias concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo MS adicionado con 100 mg/l de Cisteína. Se sembraron 15 brotes individualizados distribuidos en 10 frascos por tratamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Tratamientos ensayados para el alargamiento de los brotes individualizados a partir de cotiledones con hipocótilo en medio MS (1962) adicionado con los reguladores de crecimiento BAP, ANA, Kin y GA₃

Reguladores de Crecimiento				
	BAP	ANA	Kin	GA ₃
Trat	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1	--	--	--	0.5
2	--	--	--	1.0
3	--	--	--	1.5
4	--	--	--	2.0
5	2.0	--	--	--
6	2.0	--	--	0.05
7	--	0.01	0.1	0.05

6.6. Secuencias de desarrollo en cotiledones con hipocótilo (explantes originales)

Después de observar que el individualizar los brotes generados de los cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días no daba un buen resultado, se procedió a remover los tejidos necrosados de los cotiledones con hipocótilo (explantes originales) provenientes de tratamientos con Kin, ANA o ambas, transfiriéndose posteriormente a subcultivos sucesivos en donde se intercalaron etapas de inducción de brotes nuevos, elongación y fortalecimiento de brotes preexistentes en medios frescos. En cada

transferencia se probaron diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento Kin, BAP, IBA y ANA. El medio basal utilizado fue MS adicionado con ácido Acético, ácido Cítrico y Cisteína en una concentración de 100 mg/l cada uno. Cabe señalar que repetidas transferencias de explantes originales a medios frescos son recomendables para evitar la oxidación y al mismo tiempo estimular la formación de brotes múltiples en algunas especies de éste género (Shekhawat, 1993), por lo que se establecieron tres secuencias de desarrollo con 1, 3 y 5 subcultivos respectivamente:

-Primera secuencia: se cultivaron 75 cotiledones con hipocótilo en MS con Kin para la inducción inicial de brotes y se transfirieron después de los primeros 15 días de cultivo a un primer subcultivo para el desarrollo y la multiplicación de los mismos en dos combinaciones de BAP, ANA y Kin, con la adición de IBA para estimular el enraizamiento de los brotes inducidos. Sólo 40 explantes sobrevivieron a la contaminación por bacterias en el cultivo (Diagrama 2).

Diagrama 2.- Primera secuencia de desarrollo con un subcultivo.

Inducción de brotes

Kin (0.01 mg/l)



Desarrollo de brotes preexistentes y nuevos y el enraizamiento de los mismos en:

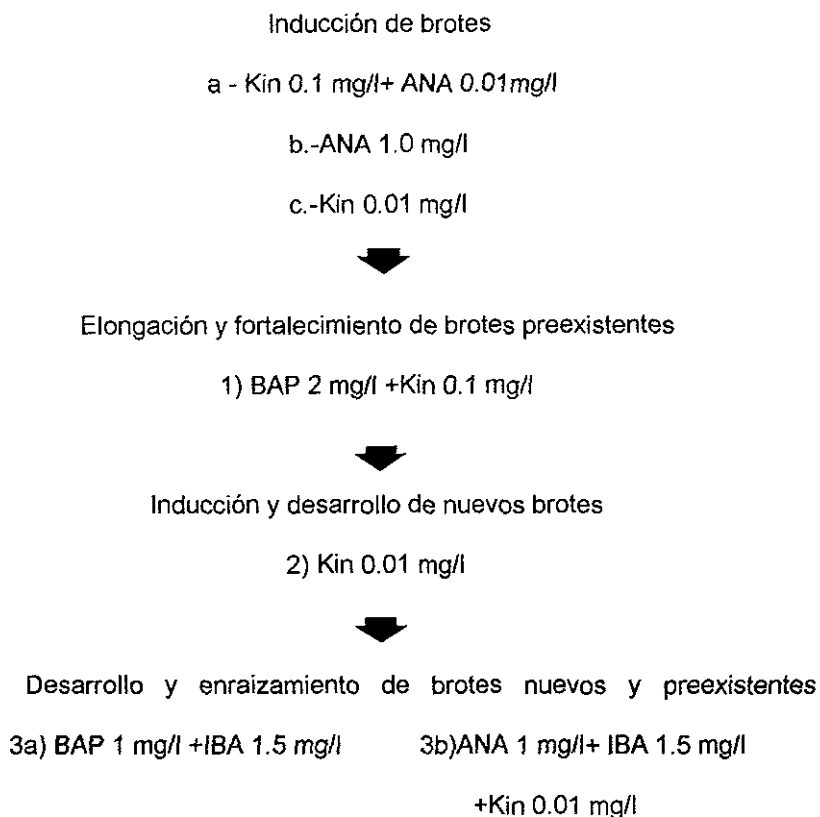
1a) BAP(1.0 mg/l)+IBA (1.5 mg/l)

1b) ANA (1.0 mg/l)+ IBA (1.5 mg/l)

+ Kin (0.01mg/l)

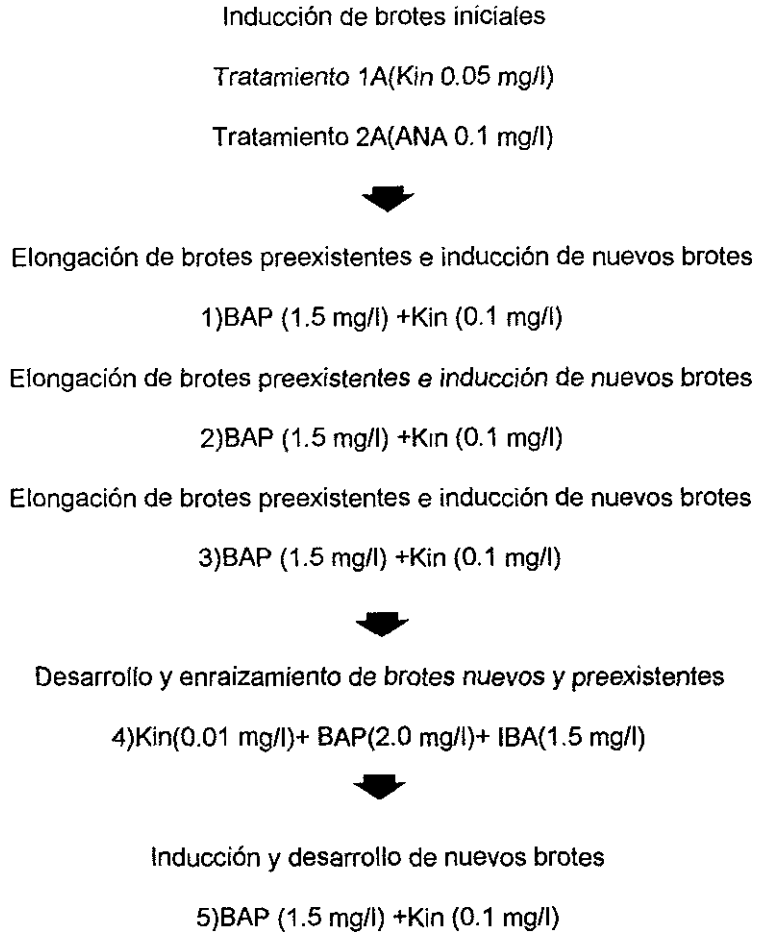
-Una vez que se indujeron brotes iniciales en Kin y ANA solas y en combinación a partir de 106 cotiledones con hipocótilo; la segunda secuencia de desarrollo consistió de tres subcultivos consecutivos de los explantes originales (cotiledones con hipocótilo) en donde se expusieron a diferentes reguladores de crecimiento, como se señala en el Diagrama 3.

Diagrama 3.- Segunda secuencia de desarrollo con 3 subcultivos.



-Tercera: consistió en subcultivar los explantes originales (cotiledones con hipocótilo) en Kin 0.05 mg/l (Tratamiento 1A) o ANA 0.1 mg/l (Tratamiento 2A) para inducir los primeros brotes y subcultivarlos *posteriormente* cada 15 días en medios frescos de MS adicionado con BAP, Kin e IBA haciendo un total de 5 subcultivos a medio fresco (Diagrama 4).

Diagrama 4.- Secuencia o fase de desarrollo con 5 subcultivos.



En la secuencias 1 y 2 se repitieron 4 veces los experimentos con 4 explantes en cada frasco para obtener un total de 16 explantes por tratamiento; en la tercera secuencia se sembraron 3 explantes por frasco y 16 frascos por tratamiento.

Los resultados se registraron cada 8 días hasta completar 44 semanas en cultivo.

6.7. Enraizamiento

a) En brotes individualizados originados de cotiledones con hipocótilo

Los brotes inducidos *in vitro* fueron separados mecánicamente del explante original (individualizados) y cultivados bajo diferentes tratamientos de enraizamiento en donde el medio basal utilizado fue MS. Los tratamientos fueron:

a) Medio básico al 50% de su concentración, con los aditivos Cisteína, ácido Ascórbico y Cítrico (100 mg/l cada uno), adicionado con IBA 0.1 mg/l. Se cultivaron cincuenta y siete brotes individualizados.

b) En medio MS adicionado con AIA 0.1 mg/l más ANA 0.1 mg/l. Se sembraron cuarenta y siete brotes individualizados.

b) En brotes originados de cotiledones con hipocótilos sin individualizar.

Se sembraron ciento trece explantes originales en MS al 100% con los reguladores de crecimiento BAP, Kin, ANA e IBA en las tres secuencias de crecimiento.

6.8. Trasplante a suelo

Se trasplantaron a suelo 41 brotes enraizados de 1.5 a 2.0 cm de longitud. El sustrato fue una combinación de tepojal, arena de río y tierra negra (2:1:2) en vasos de unicel cubiertos con bolsas de polietileno que permanecieron 4

meses en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h luz, intensidad luminosa de 2000 lux, a temperatura de $26^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.9. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los tratamientos realizados para la inducción de brotes a partir de cotiledones con hipocótilo con ANA en las concentraciones 0;0.1; 0.5;0.01;1.0 mg/l en combinación con Kin 0.0; 0.01; 0.05; 0.1 mg/l (en donde se sembraron 4 explantes por frasco y 4 repeticiones en 20 tratamientos) se analizaron mediante una prueba de Análisis de Varianza factorial ANOVA ($p>0.05$) a x b o de dos factores. Para determinar diferencias significativas en los tratamientos ensayados para la inducción de brotes se aplicó la prueba LSD de Fisher para comparación de medias. El paquete estadístico utilizado en este estudio fué Statistica w/4.1.

7.RESULTADOS Y DISCUSION

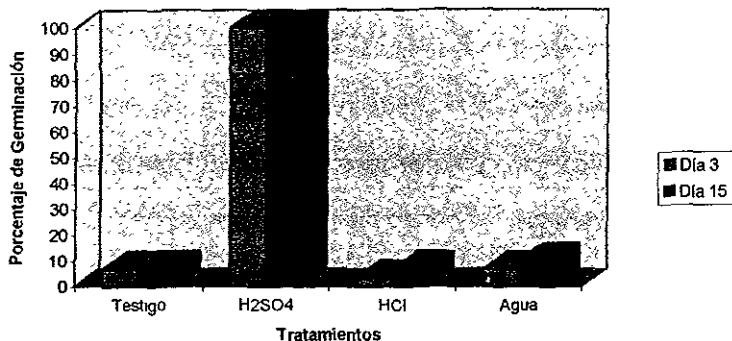
7.1.Germinación

Las semillas de *Prosopis* tienen una cubierta seminal dura y requieren de un pretratamiento antes de sembrarlas. Killian (1988) informa que la dormancia innata encontrada en las semillas del género depende de la dureza de la cubierta seminal, efecto que generalmente desaparece con tratamientos iniciales en agua a temperatura de ebullición y/o mediante el uso de HCl o H₂SO₄. Bohra y col. (1994) reportaron que la escarificación mecánica era el tratamiento más efectivo para eliminarla, sin embargo en algunas especies sólo se obtuvieron resultados con H₂SO₄ (Harsh y Tewari, 1994; Nandwani y Ramawat, 1993). Para *P. ferox* la germinación ocurrió con tratamientos consecutivos de H₂SO₄ concentrado por 10 minutos, seguida por ebullición y posterior remojo en agua (Jordan, 1995). En nuestro caso la germinación se presentó tres días después de iniciado el cultivo en el 100% (30/30) de las semillas que se escarificaron con H₂SO₄, en las semillas tratadas con HCl sólo se obtuvo la germinación del 6.6 % (2/30) al 13.3 % (4/30) después de 15 días en MS y agua destilada respectivamente. De las semillas que se sometieron a escarificación térmica sólo germinó el 10 % (3/30) después de 15 días *in vitro* en MS y un 6.6% (2/30) en agua destilada (Gráficas 1 y 2). Respecto al sustrato utilizado después de 15 días de cultivo se observó un ligero incremento en la germinación en germinadores con agua destilada en retación con aquellas cultivadas en medios sólidos MS al 25%, sin embargo

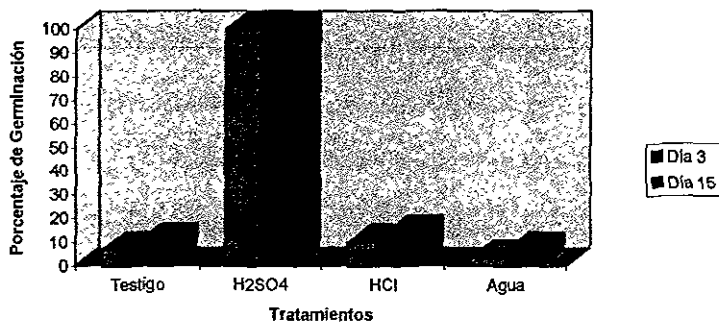
estas diferencias no fueron relevantes; asimismo no se encontraron variaciones respecto al tiempo de germinación coincidiendo ésta al tercer día en ambos sustratos (Gráficas 1 y 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar para ensayos subsecuentes de germinación la técnica ensayada en este estudio para la desinfestación de las semillas de *Prosopis sp.* para su establecimiento *in vitro* (ya que no se observó contaminación por microorganismos durante el cultivo de semillas de esta especie), la escarificación con H_2SO_4 por ser la más productiva y la utilización de germinadores con agua destilada esterilizada y no medios mínimos.

Gráfica 1.- Porcentaje de germinación de semillas de *Prosopis* sp en MS, sometidas a diferentes tratamientos.



Gráfica 2.- Porcentaje de germinación de semillas de *Prosopis* sp en germinadores con agua destilada sometidas a diferentes tratamientos.



7.2. Tipo de explante con mayor potencial morfogenético

A) En explantes de plantas de 10 días

Cuatro tipos de explantes cotiledonares provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de 10 días se evaluaron en relación a su capacidad regenerativa. La mejor respuesta morfogenética en la formación de brotes se presentó en cotiledones con hipocótilo, en hipocótilos aislados sólo se obtuvo callo, en cotiledones aislados y en cotiledones sin hipocótilo se formaron brotes y raíces en un porcentaje muy bajo.

Cotiledones con hipocótilo:

Después de permanecer por 4 semanas de cultivo en las concentraciones de ANA y Kin (0/0; 0.1/0.01; 0.5/0.05; 0.01/0.10; 1.0/0.05 mg/l) la mejor respuesta morfogenética se obtuvo en cotiledones con hipocótilo, ya que en todos los tratamientos de un 83 a 100 % de los explantes formaron de 0.66 a 1.5 brotes y raíces en un 50 a 100 % de los explantes (Figura 1). No se observó la formación de callo con excepción del tratamiento con 1.0/0.5 mg/l en donde se obtuvo un 25 % de explantes con callo (Tabla 1).

Cotiledones sin hipocótilo:

En cotiledones sin hipocótilo los explantes también formaron brotes en todos los tratamientos obteniéndose una respuesta de un 33.3 a un 66.6% de explantes con brotes; y raíces en un 50 a 100 % de los mismos. Sólo se formó callo en el tratamiento con 0.5/0.05 mg/l de ANA y Kin (Tabla 1).

Hipocótilos:

En hipocótilos aislados sólo se obtuvo la formación de callo en los tratamientos con 0.1/ 0.01 y 0.5/0.05 mg/l de ANA y Kin y en el lote testigo.

Cotiledones:

En cotiledones aislados se formaron callo, brotes y raíces en un porcentaje muy bajo en todos los tratamientos con excepción de 0.5 mg/l de ANA y Kin 0.05 mg/l en donde sólo se obtuvo rizogénesis (Tabla 1).

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que en cotiledones con hipocótilo se presentó la mejor respuesta morfogénica, coincidiendo con los resultados reportados por Nandwani y Ramawanat (1993) en donde para *P. tamarugo* el máximo número de brotes se generó a partir de explantes cotiledonares. Estos mismos autores mencionan que el sistema de regeneración de éste tipo de explantes es altamente reproducible y puede ser utilizado para la multiplicación a gran escala de especies de este género. Bajaj (1991) y Jordan (1995) reportan que los cotiledones juegan un papel importante en la producción de brotes de explantes de plántulas los cuales podrían suplir en los cultivos a reguladores de crecimiento endógenos o porque son tejidos que tienen una condición especialmente juvenil.

Tabla 1.- Respuesta morfogénica en explantes cotiledonares después de 30 días de cultivo *in vitro* en MS adicionado con fitorreguladores.

Explante	Reguladores de crecimiento mg/l		CALLO		Ex.con brotes/ Ex. totales*		N° brotes/ Explante**		RAIZ	
	ANA	KIN	N°	%	N°	%	N°	X	N°	%
Hipocótilo	0	0	6/12	50	2/12	16.6	3/12	0.25	--	--
	0.1	0.01	2/12	16.6	--	--	--	--	--	--
	0.5	0.05	3/12	25	--	--	--	--	--	--
	0.01	0.10	--	--	--	--	--	--	--	--
	1.0	0.5	--	--	--	--	--	--	--	--
Cotiledón	0	0	--	--	2/12	16.6	1/12	0.08	--	--
	0.1	0.01	2/12	16.6	1/12	8.3	2/12	0.16	9/12	75
	0.5	0.05	--	--	--	--	--	--	10/12	83
	0.01	0.10	6/12	50	1/12	8.3	1/12	0.08	2/12	16.6
	1.0	0.5	3/12	25	1/12	8.3	1/12	0.08	6/12	50
Cotiledón con hipocótilo	0	0	--	--	10/12	83.3	18/12	1.5	--	--
	0.1	0.01	--	--	12/12	100	16/12	1.3	6/12	50
	0.5	0.05	--	--	12/12	100	13/12	1.08	12/12	100
	0.01	0.10	--	--	12/12	100	12/12	1.0	8/12	66.6
	1.0	0.5	3/12	25	10/12	83.3	8/12	0.66	12/12	100
Cotiledón sin hipocótilo	0	0	--	--	4/12	33.3	1/12	0.08	--	--
	0.1	0.01	--	--	8/12	66.6	9/12	0.75	6/12	50
	0.5	0.05	6/12	50	4/12	33.3	2/12	0.16	6/12	50
	0.01	0.10	--	--	8/12	66.6	5/12	0.41	4/12	33.3
	1.0	0.5	--	--	8/12	66.6	8/12	0.66	12/12	100

*Explantes con brotes/ Explantes totales

** Número de brotes por explante

N° de explantes con respuesta

Se cultivaron 3 explantes por frasco y 4 frascos por tratamiento con 12 explantes en total.

B) En explantes de planta de 12 meses

Estacas nodales de una planta de 12 meses fueron evaluadas en relación con su capacidad morfogénica, lográndose sólo el establecimiento del cultivo aséptico y la estimulación del desarrollo de yemas axilares en el 100% de las estacas nodales con Kin 5.0 mg/l combinado con ANA 0.1 mg/l (después de 15 días de cultivo *in vitro*); sin embargo, al subcultivar los explantes en BAP 3.0 mg/l en combinación con Kinetina 0.1 mg/l con la finalidad de elongar las yemas, **no hubo respuesta morfogénica**, sólo necrosis de los tejidos y posterior muerte de los explantes. Los resultados obtenidos en esta etapa del cultivo impidieron continuar con los experimentos en explantes de plantas de 12 meses. Estos resultados contrastan con los reportados por Yao Dun Yi en 1989 y por Shekhawat (1993) para *P. chilensis* y *P. cineraria* en donde elevadas concentraciones de BAP fueron el factor clave para estimular la formación y el crecimiento de brotes, sin embargo hay que considerar que el potencial morfogénico en cultivo de tejidos y órganos *in vitro* está afectado por diversos factores como son el grado de madurez de los explantes, la estacionalidad, factores fisiológicos inherentes en las especies y diferencias genotípicas entre individuos (Edwin, 1993). Asimismo el alto grado de cruzamientos interespecíficos que ocurren en este género hacen más difícil establecer estas diferencias. Algunos sistemas de regeneración específicos, como es el proceso de inducción de nuevos brotes a partir de ejes embrionarios de semillas, parece representar una respuesta ventajosa, pero su mayor limitante es que no permite copias idénticas ni preservación de los rasgos de

las plantas maternas en los propágulos, característica que evidencian otros métodos, entre ellos el cultivo de secciones nodales y polinodales. Esto conlleva a la conveniencia de la elección preponderante de material juvenil, condición requerida en la inducción de morfogénesis en especies leñosas, la etapa juvenil en plantas leñosas es manifestada por el crecimiento prolongado de brotes vigorosos y en su habilidad para proveer estacas que formen raíces adventicias. Las estacas tomadas de brotes adultos pueden ser enraizadas pero la frecuencia del éxito es baja, especialmente en especies recalcitrantes a propagarse por cultivo *in vitro* como es el caso de *Prosopis sp.* (Edwin, 1993).

7.3.Inducción y desarrollo de brotes

A: En cotiledones con hipocótilo (plantas de 10 días)

Los resultados obtenidos para la inducción de brotes y posterior multiplicación en *Prosopis sp.* utilizando cotiledones con hipocótilo fueron los siguientes:

Después de 30 días en cultivo de los tratamientos ensayados con BAP/AIA, se obtuvieron de 2 a 3 brotes con tallos gruesos con callo blanco y cristalino y sin raíces en el 100% de los explantes originales (cotiledones con hipocótilo). La formación de brotes y callo en el 100% de los explantes originales en los tratamientos con BAP/ANA fue evidente después de 5 semanas *in vitro*, la mejor respuesta en la formación de brotes se presentó en 0.1 mg/l de ANA con un porcentaje de 87 % con 1.38 brotes por explante.

El 95% de los cotiledones con hipocótilo del resto de los tratamientos permanecieron cloróticos, hiperhidratados y sin crecimiento.

Al incorporar la Kin en las concentraciones 1.0, 3.0 y 5.0 mg/l, se observó un incremento en el porcentaje de explantes originales (cotiledones con hipocótilo) con brotes a un 88% con Kin 3.0 mg/l combinado con ANA 0.1 mg/l. En cuanto al número de brotes por explante, la mayor respuesta se presentó en 5.0 mg/l de Kin con 0.3 mg/l de ANA, con la formación de 2.25 brotes por explante. Sin embargo a pesar de que los brotes formados inicialmente estaban vigorosos y muy foliados después de 5 semanas en cultivo los brotes se observaban muy deteriorados (Figura 2).

Una de las estrategias que se han utilizado para la micropropagación de especies leñosas es la multiplicación de brotes. En principio la multiplicación explota la utilización de citocininas en la inducción del crecimiento de brotes sobre condiciones controladas *in vitro*, sin embargo el crecimiento y la organogénesis podrían ser reguladas por el balance entre citocininas y auxinas en el medio de cultivo (Einset, 1991). Por otro lado en especies leñosas hay un mayor número de factores a considerar que influyen en la eficiencia de la inducción y la multiplicación de brotes y su crecimiento en cultivo *in vitro*, por ejemplo plantas individuales de *Prosopis* varían en su composición genética resultando en diferentes expresiones fisiológicas y por lo tanto regenerativas (Shekhawat, 1993; Jordan, 1995).

En los explantes cultivados con Kin y ANA (0, 0.1, 0.05, 0.1 y 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l respectivamente) se formaron brotes vigorosos con tallos gruesos, con numerosas hojas y 1 a 5 raíces en el 100% de tratamientos (Figura 3).

Al comparar las respuestas entre los tratamientos con Kin/ANA mediante un Análisis de Varianza de diseño factorial se observó una interacción Kin/ANA tanto para porcentaje de explantes con brotes como para número de brotes totales, con un nivel de significancia del 0.05 (Tabla 2).

Al efectuar la prueba LSD de Fisher se observó que para el porcentaje de explantes con brotes las combinaciones de reguladores de crecimiento que dieron un mayor promedio fueron: 0/0.1; 0.05/0, 0/0.01; 0.01/0 mg/l de Kinetina con ANA respectivamente, con promedio de 0.775 y 0.625 para los tratamientos restantes. No habiéndose encontrado diferencias estadísticas significativas para $P > 0.05$ entre los tratamientos 3, 11, 6, 2, 1,5,8,17,7 y 15 (Tabla 3 y Gráfica 3).

Respecto al número de brotes por explante la mayor respuesta se encontró en el tratamiento con 0.05 mg/l de Kin sin la presencia de ANA, con 8.0 brotes por explante; también se observó que los tratamientos de Kin con 0.01 mg/l sin auxina y ANA 0.1 mg/l sin Kin dieron 6.25 brotes por explante respectivamente, aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos tratamientos (Tabla 3a y Gráfica 3).

Tabla 2.- ANOVA de la interacción entre los reguladores de crecimiento Kin/ANA en *Prosopis* sp.

Fuente de variación	F - calculada	Probabilidad ¹
Porcentaje de explantes con brote	2.280534	0.018324 *
Número de brotes totales	2.593709	0.007595 *

(1) Con 0.05 nivel de significancia.

Tabla 3.- PRUEBA LSD DE FISHER para porcentaje de explantes con brotes.

Reguladores de Crecimiento		Tratamiento	Porcentaje de Explantes c/ brotes*
Kin (mg/l)	ANA (mg/l)		
0	0.1	3	0.775 ^a
0.05	0.0	11	0.625 ^a
0.01	0.0	6	0.625 ^a
0.0	0.01	2	0.625 ^a
0.0	1.0	5	0.540 ^a
0.0	0.0	1	0.506 ^a
0.01	0.1	8	0.477 ^a
0.1	0.01	17	0.477 ^a
0.01	0.01	7	0.457 ^a
0.05	1.0	15	0.437 ^a
0.05	0.5	14	0.312 ^b
0.1	0.5	19	0.312 ^b
0.01	0.5	9	0.1875 ^b
0.01	1.0	10	0.1875 ^b
0.1	0.0	16	0.1875 ^b
0.1	1.0	20	0.1875 ^b
0.0	0.5	4	0.145 ^b
0.05	0.1	13	0.125 ^b
0.05	0.01	12	0.125 ^b
0.1	0.1	18	0.125 ^b

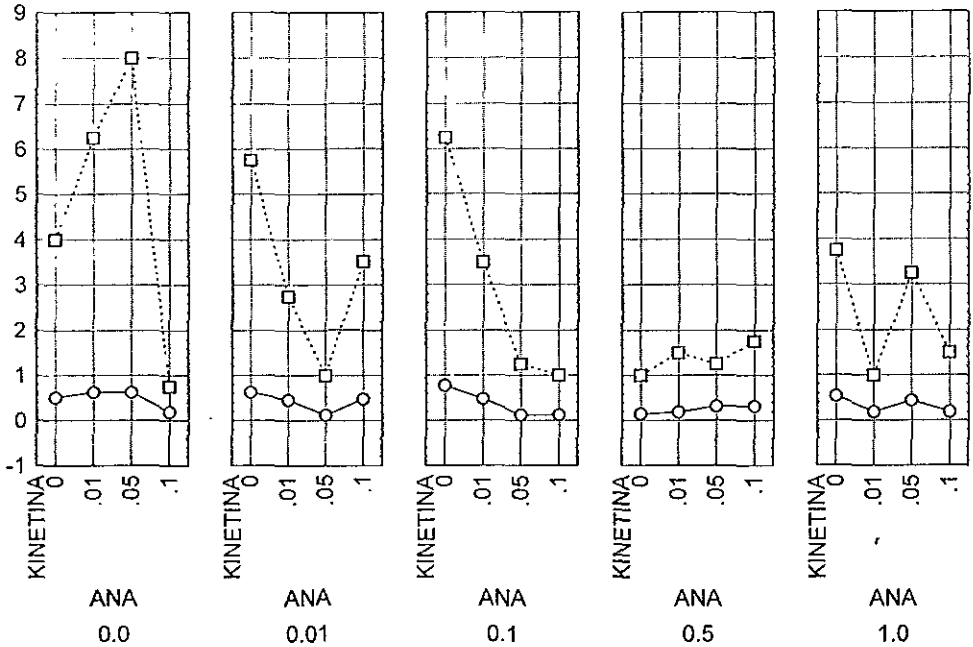
(*) Letras diferentes implican valores significativamente diferentes entre sí.

Tabla 3a.- PRUEBA LSD DE FISHER para número de brotes por explante

Reguladores de Crecimiento		Tratamiento	Número de brotes por explante*
Kin (mg/l)	ANA (mg/l)		
0.05	0.0	11	8.0 ^a
0.0	0.1	3	6.25 ^{ab}
0.01	0.0	6	6.25 ^{ab}
0.0	0.01	2	5.75 ^{ab}
0.0	0.0	1	4.0 ^{bc}
0.0	1.0	5	3.75 ^{bc}
0.01	0.1	8	3.50 ^{bc}
0.1	0.01	17	3.50 ^{bc}
0.05	1.0	15	3.25 ^{bc}
0.01	0.01	7	2.75 ^{bc}
0.1	0.5	19	1.75 ^c
0.01	0.5	9	1.50 ^c
0.1	1.0	20	1.50 ^c
0.05	0.1	13	1.25 ^c
0.05	0.5	14	1.25 ^c
0.0	0.5	4	1.0 ^c
0.01	1.0	10	1.0 ^c
0.05	0.01	12	1.0 ^c
0.1	0.1	18	1.0 ^c
0.1	0.0	16	1.0 ^c

(*) Letras diferentes implican valores significativamente diferentes entre sí.

Gráfica 3.- PRUEBA LSD DE FISHER para porcentaje de explantes con brotes y número de brotes por explante de *Prosopis* sp.



—○—PORCENTAJE DE EXPLANTES

..□...NUMERO DE BROTES

B: En explantes de planta de 12 meses

Como se mencionó en el apartado anterior en estacas nodales de 12 meses **no se logró** el desarrollo de brotes a partir de yemas axilares ni el desarrollo de brotes adventicios, sólo se presentó la necrosis de los tejidos y posterior muerte de los explantes. Por tal motivo sólo se continuó trabajando con brotes desarrollados a partir de explantes de plántulas de 10 días.

7.4. Individualización y desarrollo de brotes originados a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días

Brotes generados *in vitro* fueron separados mecánicamente individualizándose y cultivándose fuera de los explantes originales (cotiledones con hipocótilo) para su elongación y el fortalecimiento de sus tallos, por lo que una vez inducidos los brotes, se individualizaron y se sometieron a diferentes tratamientos con GA₃, ANA, BAP y Kin. Los resultados obtenidos de los tratamientos fueron los siguientes:

Después de permanecer por 4 semanas en los tratamientos con GA₃ (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l) la mejor respuesta se encontró con la adición de 0.5 mg/l con una elongación de 3.5 cm en promedio en cada brote; de los tratamientos con 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l no hubo elongación sólo clorosis y muerte de los explantes (Figura 4).

En el tratamiento con ANA (0.01mg/l), Kin (0.1 mg/l) y GA₃ (0.5 mg/l) se estimuló la formación de yemas axilares, se elongaron las hojas preexistentes pero se presentó clorosis y caída de las mismas (datos no mostrados). De acuerdo a Jordan (1987b), la adición de GA₃ en el medio de cultivo favorece el crecimiento de yemas axilares (esto es importante porque los explantes normalmente muestran la abscisión de las hojas después de algunos días en cultivo y las yemas axilares no inician su crecimiento inmediatamente después de la formación de raíces) pero, por otro lado el GA₃ combinado con Kin no conduce a la formación de plántulas e inhibe el enraizamiento en *P. chilensis* y *P. tamarugo*.

En BAP (2.0 mg/l) se observaron brotes vigorosos pero con las hojas y brotes con pequeñas deformaciones. En BAP (2.0 mg/l) con GA₃ (0.5 mg/l) sólo se observó la formación de 2 a 4 brotes pero sin crecimiento.

7.5. Secuencias de desarrollo en explantes originales

(cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días)

De acuerdo con Shekhawat (1993) la transferencia en repetidas ocasiones a medios frescos es esencial para prevenir la defoliación, el deterioro de los cultivos y para favorecer el crecimiento sostenido de los brotes en especies leñosas. Por lo que en este estudio después de obtener una respuesta pobre en los tratamientos para elongar los brotes individualizados, los explantes originales se sometieron a una serie de transferencias o subcultivos cada tres semanas con los que se pretendía obtener la elongación, fortalecimiento de los tallos, la multiplicación y enraizamiento de los brotes; por lo que

después de inducirlos en Kin o en ANA se cultivaron en medios frescos con MS adicionado con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento Kin, BAP, IBA y ANA, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Respuesta con un subcultivo

La respuesta morfológica obtenida en la inducción con Kin (0.01 mg/l) fue la siguiente: de 75 explantes originales 40 respondieron formando 1 o 2 brotes por explante con una longitud de 0.5 a 1.0 cm con tallos muy delgados. Estos 40 explantes se dividieron en dos grupos de 20 cada uno al pasarlos al siguiente medio de cultivo.

i) Al transferir los 20 explantes a un medio con BAP (1.0 mg/l) mas IBA (1.5 mg/l) se incrementó el número de brotes a dos en el 65% de los explantes (13/20). Sin embargo la respuesta morfológica fué muy variable, debido a que los brotes formados presentaban tallos gruesos y vigorosos o presentaban tallos delgados con poco vigor, hojas deformes y ápices quemados.

ii) En ANA (1.0 mg/l) con IBA (1.5 mg/l) y Kin (0.01 mg/l) se incrementó el número de brotes en un 75% (15/20) de los explantes, obteniéndose 2.26 brotes por explante con tallos gruesos y elongados, con la formación continua de nuevos brotes.

La presencia de IBA combinado con BAP o ANA a partir del primer subcultivo dió como resultado en ambos tratamientos la formación de 3 raíces por explante en un 65% (13/20) a un 70% (14/20) de éstos con una longitud aproximada de 0.5 a 5 cm.

b) Respuesta con tres subcultivos

La mejor respuesta para la inducción de brotes se presentó a las cuatro semanas de cultivo *in vitro* en los explantes con (0.01 mg/l) de Kin con un 68.75% de explantes con brotes, en el tratamiento con Kin (0.1 mg/l) en combinación con ANA (0.01 mg/l) se indujo un 52 % y en ANA (1.0 mg/l) un 35 %

Al transferir los explantes originales a un primer subcultivo con BAP (2.0 mg/l) y Kin (0.1 mg/l) se logró un incremento en el número y el porcentaje de explantes con brotes y en la longitud de los brotes previamente formados de 0.5 a 1.0 cm y cuando permanecieron por más de cinco semanas en este mismo tratamiento el incremento llegó a ser hasta de 4 cm por brote.

Al transferirlos de nuevo a un medio para inducción con Kin (0.01 mg/l), los brotes continuaron elongándose, desarrollando nuevos brotes e incrementando su vigor (Tabla 4). También se observó el amarillamiento de las hojas, senescencia en los ápices, necrosis y la posterior pérdida de algunos de los brotes inicialmente formados. Desafortunadamente en esta etapa del cultivo se presentó una pérdida por contaminación de 54 explantes y los 10 explantes restantes se pasaron a un tercer subcultivo.

En la siguiente transferencia a BAP (1.0 mg/l) con IBA (1.5 mg/l) (resultados no mostrados en la tabla) los brotes presentaron clorosis hasta llegar a defoliarse totalmente (debido probablemente a la presencia de una elevada concentración de etileno en el frasco). A pesar de que el medio de cultivo contenía IBA con la finalidad de estimular el enraizamiento no se observó ni crecimiento de raíces previamente formadas ni formación de nuevas raíces

(la pérdida de la capacidad de regeneración se ha asociado a cambios génicos por la exposición prolongada a los reguladores de crecimiento; Pérez Ponce, 1998).

En el subcultivo en ANA (1.0 mg/l), Kin (0.01 mg/l) e IBA (1.5 mg/l) se estimuló el desarrollo de brotes nuevos y la formación de dos raíces por explante con una longitud aproximada de 0.5 a 1.0 cm en explantes que no habían respondido previamente, sin embargo no hubo crecimiento en brotes ya formados (resultados no mostrados en tabla). Los resultados observados en el tercer subcultivo se pudieron deber a la presencia de bacterias en el medio de cultivo.

Tabla 4.- Respuesta morfogénica de cotiledones con hipocótilo de *Prosopis sp.* cultivados por 4 semanas en a) Kin 0.01 mg/l, b) Kin 0.1 mg/l en combinación con ANA 0.01 mg/l y en c) ANA 1.0 mg/l; y subcultivados en I) BAP 2.0 mg/l y Kin 0.01 mg/l por 7 semanas y por 10 semanas en II) Kin 0.01 mg/l.

ELONGACION Y FORTALECIMIENTO DE BROTES															
TRATAMIENTO	INDUCCIÓN DE BROTES 4 SEMANAS					SUBCULTIVO I 7 SEMANAS					SUBCULTIVO II 10 SEMANAS				
	Explantos c/ brotes/ Ex totales	N° Brotos/ Ex totales	Longitud de brotes (cm)	Vigor de los brotos	Raíz	Explantos c/ brotes/ Ex totales	N° Brotos/ Ex totales	Longitud de brotes (cm)	Vigor de los brotos	Raíz	Explantos c/ brotes/ Ex totales	N° Brotos/ Ex.totales	Longitud de brotes (cm)	Vigor de los brotos	Raíz
	%				%	%			%	%					%
KIN 0.01 mg/l	68.75	1.8	0.5-3.5	+	18.75	81.25	2.21	1.0-4.50	++	18.75	81.25	2.3	2.0-5.50	+++	18.75
KIN 0.01+ANA 1.0 mg/l	52.0	1.38	0.3-4.0	+	28.0	80.0	2.15	0.8-5.0	++	28.0	80.0	2.38	2.8-6.0	+++	28.0
ANA 1.0 mg/l	35.0	1.5	0.2-2.0	++	52.63	55.0	2.27	0.7-3.0	++	50.0	75.0	2.38	1.7-4.0	++	52.0

+ Brotes delgados poco vigorosos

++ Brotes vigorosos

+++ Brotes muy vigorosos

c) Respuesta con cinco subcultivos

Se observó que independientemente del medio de inducción del que provenían los explantes (Kin o ANA) y del porcentaje inicial de explantes con respuesta, 96.9% (32/33) y 76.6% (23/30), la transferencia en los tres primeros medios frescos con BAP 1.5 mg/l y Kin 0.1 mg/l cada 15 días, incrementó hasta en un 100% el porcentaje de explantes con brotes (Tabla 5). Al incluir en el medio el regulador de crecimiento IBA en la cuarta transferencia este porcentaje de explantes con brotes disminuyó en un 9 y 6% respectivamente, pero al volver a subcultivar en BAP 1.5 mg/l y Kin 0.1 mg/l, se volvió a incrementar a un 100% en ambos ensayos (1A y 2A, Tabla 5).

El incremento en el número de brotes por explante fue notorio a lo largo de los cuatro primeros subcultivos, decayendo al agregar el IBA en el medio de cultivo; observándose el mismo patrón en la longitud y número de entrenudos de los brotes.

El grosor de los tallos de los brotes se mantuvo constante a lo largo de los subcultivos (ca. 0.1 mm), las hojas se mantuvieron verdes, incluso llegando a incrementar en número a lo largo de los 2 primeros subcultivos, en el tercero decrecieron de 10 a 6, y al agregar el IBA en el cuarto subcultivo hubo un decremento de 6 a 2, llegando a carecer totalmente de éstas hojas 6 brotes del tratamiento 2A (Tabla 5).

A pesar de que desde el primer subcultivo el 72% (24/33, Tratamiento 1A) y el 43% (13/30, Tratamiento 2A) de los explantes formaron de 2 a 6 raíces, al agregar el IBA en el medio de cultivo se incrementó el número de éstas (de 5

a 10 en cada explante) modificándose las características que presentaban inicialmente ya que venían formándose raíces largas y delgadas y al agregar la auxina se formaron raíces cortas y muy gruesas (Figura 5). Cabe señalar que la variación en el número de explantes totales con respecto a los reportados en materiales y métodos es debida a la pérdida de material por contaminación.

Después de observar los resultados se encontró que independientemente del número de subcultivos a los que se sometió a los explantes, los cambios a medio fresco propiciaron el incremento en el vigor de los brotes y estimulación en la formación de nuevos brotes en los explantes originales (Figuras 6 y 7). Los resultados anteriores coinciden con los reportados por Harris (1992) y Shekhawat (1993) en donde informan que repetidas transferencias de explantes de especies leñosas a un medio conteniendo citocinina (BAP) causa rejuvenecimiento de tejidos de plantas adultas. Estos tratamientos probablemente liberan al propágulo de fenómenos experimentados en la fase adulta de la planta y posiblemente reducen efectos inhibitorios acumulados causando revigorización, habilidad de enraizar, mejoran los índices de multiplicación de brotes, provocan activación y reacondicionamiento de meristemas. Sin embargo es importante hacer notar que es el balance o interacción de los reguladores del crecimiento, más que la suma de sus acciones individuales lo que da la clave del desarrollo (Bidwell, 1990). Otro aspecto importante a considerar es que al cambiar a los explantes a medios frescos los estamos liberando de gases acumulados en los recipientes los cuales pueden estar influyendo en la respuesta

morfogenética, ya que el crecimiento y desarrollo de las plantas en cultivo *in vitro* no sólo depende de la composición del medio nutritivo, también esta afectada por la composición de la atmósfera gaseosa que prevalece dentro del recipiente (por la acumulación de CO₂, etileno y otros hidrocarburos). Se sabe que el etileno en ciertas concentraciones inhibe el crecimiento de órganos inducidos en cultivo *in vitro* y puede causar senescencia y pérdida de hojas (Buddendorf-Joosten et al , 1994).

Tabla 5.- Respuesta morfogénica de explantes de *Prosopis sp.* cultivados en medio MS adicionado con Kin 0.05 mg/l (Tratamiento 1A) y ANA 0.1 mg/l (Tratamiento 2A); y subcultivados cada 3 semanas por 5 ocasiones.

S U B C U L T I V O S

Tratamiento	Kinetina 0.05 mg/l	I	II	III	IV	V
1A	%	%	%	%	%	%
% Explantes c/ Brotes	(32/33) 96.9	(32/33) 96.9	(16/16) 100	(15/15) 100	(11/12) 91.0	(12/12) 100
% Brotes/Expl	(54/33) 1.63	(77/33) 2.3	(54/16) 3.37	(58/15) 3.8	(59/11) 5.36	(53/12) 4.41
Longitud (cm)	1.73	2.30	2.25	2.42	1.61	0.6
Vigor	***	***	**	*	**	**
Entrenudos	1-2	2-3	2-3	4	1.75	1.0
Nº Hojas	2-4	6-10	10-15	6.5	2	2
Nº Raíz Long.(cm)	3 (1cm)	5-10 (1.5cm)	5-10 (1-5cm)	5-10 (1cm)	10-15 (1cm)	3 (1-2cm)
Tratamiento	ANA 0.1 mg/l	I	II	III	IV	V
2ª	%	%	%	%	%	%
% Explantes con Brotes	(23/30) 76.0	(24/27) 88.0	(24/24) 100	(21/21) 100	(18/19) 94.0	(15/15) 100
% Brotes/Expl	(37/30) 1.23	(59/24) 2.45	(65/24) 2.7	(74/21) 3.5	(90/19) 4.73	(63/15) 4.2
Longitud (cm)	1.21	1.90	1.92	2.35	1.54	1.1
Vigor	***	**	***	***	**	***
Entrenudos	1-2	2-3	2-3	3-15	1.45	1.4
Nº Hojas	2-4	9	10-15	6	2	3
Nº Raíz Long.(cm)	3 (1cm)	5 (1-3 cm)	5-10 (3 cm)	5-10 (2.5 cm)	5-10 (1 cm)	1-2 (1 cm)

***Explantes muy vigorosos

** Explantes vigorosos

*Explantes poco vigorosos

7.6. ENRAIZAMIENTO

En *Prosopis sp.* el enraizamiento se presentó en brotes sin individualizar formados a partir de cotiledones con hipocótilos durante los subcultivos (resultados descritos previamente en las secuencias de desarrollo y mostrados en la figura 5). En brotes individualizados generados de cotiledones con hipocótilo y separados del explante original, el enraizamiento se presentó con la adición de IBA 0.1 mg/l al medio, desarrollándose de 1 a 3 raíces por brote en el 65% (37/57) de los explantes con una longitud aproximada de 0.5 a 1.0 cm. Al utilizar AIA (0.1 mg/l) y ANA (0.1 mg/l) en el medio, después de 90 días *in vitro* el 40.42 % (19/47) de los brotes formaron 2 o 3 raíces delgadas de aproximadamente 0.7 cm a 1.0 cm de longitud, también se observó clorosis del ápice hacia los entrenudos, senescencia en ápices y caída de hojas.

Mientras que se ha reportado la formación de raíces en hipocótilos de *P. cineraria* (Goyal y Arya, 1981) no se han observado respuestas en otras especies de *Prosopis* probadas *in vitro* (Felker, 1983). En nodos de *P. chilensis* y *P. tamarugo* se puede expresar con relativa facilidad la rizogénesis y regeneración de plantas (Jordan et al., 1985). En *P. juliflora* el enraizamiento en estacas sólo es posible bajo un sistema de nebulización y con una temperatura de 20 a 30 °C (Nandwani y Ramawat, 1991).

De acuerdo a Jordan y col. (1985) el ANA es la única hormona requerida para la inducción radicular en *P. chilensis*, mientras que Shekhawarat (1993) indica que el IBA probó ser la mejor auxina inductora de raíces en *P.*

cineraria. Klass y col. (1987) reportaron que el IBA y el ANA tienen una gran influencia sobre el porcentaje de enraizamiento en *P. alba*, menos influencia en el número de raíces por estaca y casi no influyen en la longitud. De acuerdo a estos autores el número de raíces por estaca se eleva con el incremento de ambos reguladores, principalmente con el IBA (presumiblemente promueve la traslocación descendente de sustancias endógenas promotoras del enraizamiento de la parte superior de las hojas hacia la zona de enraizamiento; Jordan, 1987b). Tal parece que el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces y la máxima longitud son tres procesos fisiológicos diferentes, los cuales responden independientemente a la adición de reguladores de crecimiento sintéticos y parece ser que la adición de éstos no influyen de manera importante en el enraizamiento de las especies de *Prosopis* como sí lo hace la optimización del medio ambiente (el incremento de la temperatura de 20 a 35 °C, el incremento en la intensidad luminosa de $150 \mu E^{-2} s^{-1}$ a $520 \mu E^{-2} s^{-1}$ y el fotoperiodo de 12 horas)

7.7. TRASPLANTE A SUELO

En 41 plántulas generadas *in vitro* y trasplantadas a un sustrato en la cámara de crecimiento se observó el deterioro paulatino de las hojas, la necrosis de los ápices de los brotes y la pudrición de la raíz. Esto pudo deberse a que las características del medio *in vitro* son diferentes a las que prevalecen *ex vitro* y las plántulas al ser transferidas al sustrato pueden carecer de algunas estructuras o procesos fisiológicos que les permiten adaptarse. Está bien

establecido que en el medio de cultivo en donde se encuentran, además de la presencia de azúcar, el bajo intercambio de aire en los recipientes provoca una elevada humedad relativa, baja concentración de CO₂ durante el fotoperiodo y alta concentración en oscuridad, además de que la temperatura constante durante el día y la elevada presión osmótica, entre otros factores provocan que las plántulas en los estados de multiplicación y enraizamiento no desarrollen completamente la cera epicuticular. Adicionalmente hay una falta de funcionamiento de los estomas, la formación de una pequeña cantidad de raíces secundarias funcionales, poca emergencia de hojas y por lo tanto bajo crecimiento. Por ello las características del medio en el cultivo *in vitro* son consideradas las principales causas del bajo porcentaje de sobrevivencia y el relativamente bajo crecimiento de las plántulas en el estado de aclimatización (Kozai, 1991).

Se observó que para poder lograr el establecimiento de *Prosopis sp* se deberá mantener una elevada humedad relativa en el ambiente y al mismo tiempo mantener libre de hongos el sustrato, por lo que es necesario contar con sistemas sofisticados en el invernadero como son sistemas de nebulización, control de temperatura y fotoperiodo.



Fig 1 Inducción de brotes en medio MS con fitohormonas originados a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días

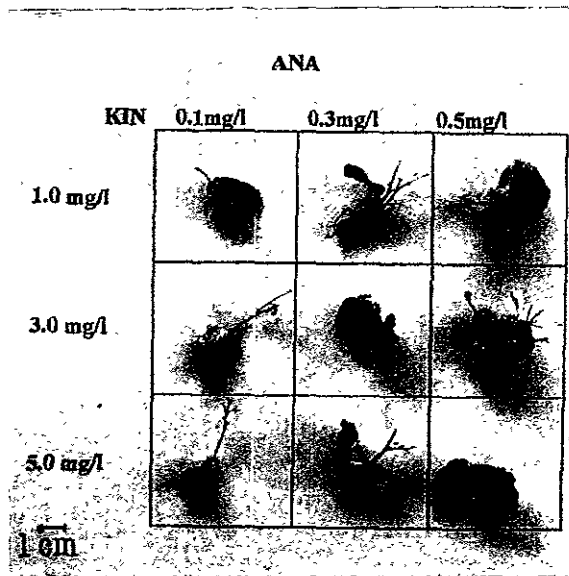


Fig 2. Formación de brotes en cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días en ANA con mayores concentraciones de Kin.

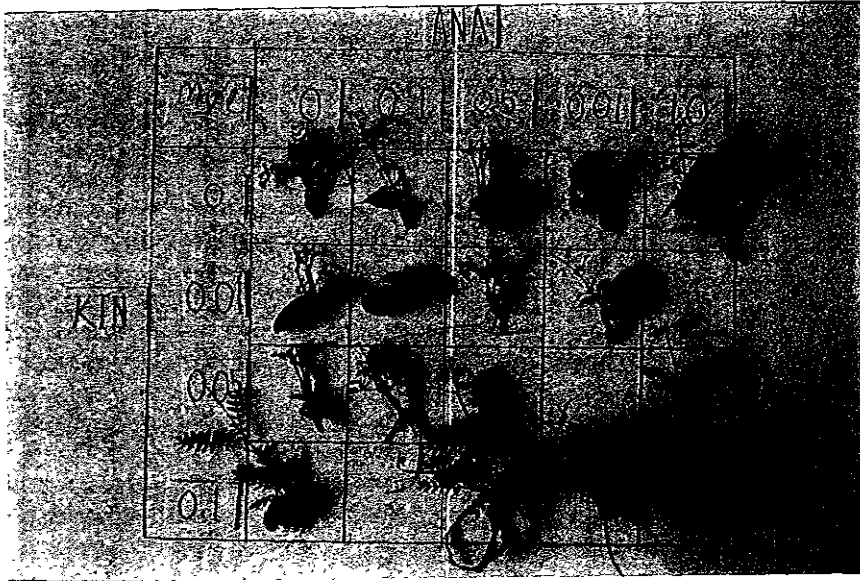


Fig 3 Formación de brotes en cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días cultivados en bajas concentraciones de Kin/ANA

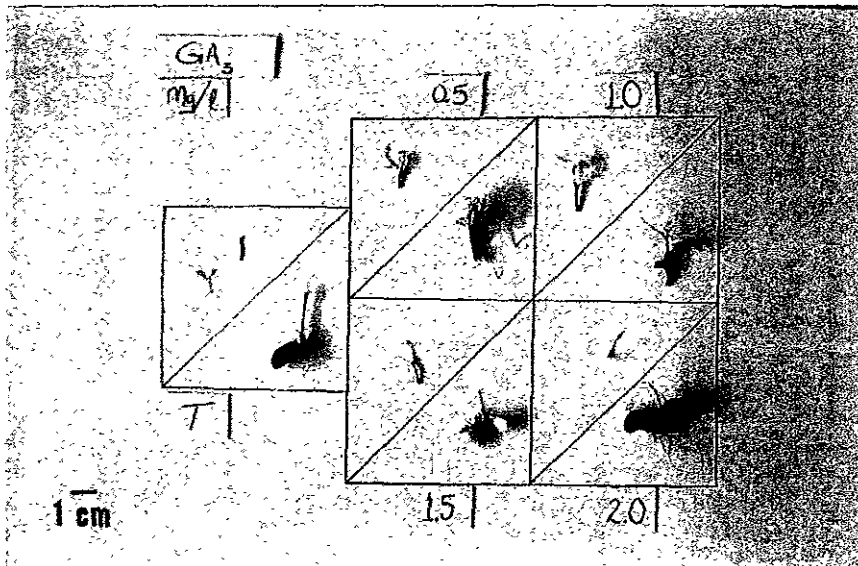


Fig 4 Brotes individualizados separados de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días y sembrados en diferentes concentraciones de GA₃.



Fig 5 Enraizamiento de brotes originados de cotiledones con hipocótilo (explantos originales) después de cinco subcultivos.

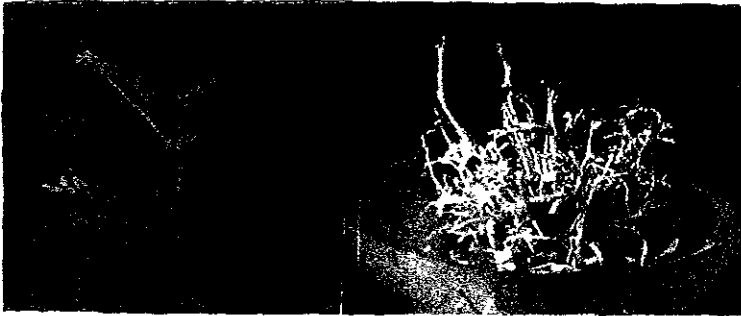


Fig 6 y 7 Formación de brotes múltiples con tallos gruesos y fortalecidos, formados a lo largo de los subcultivos

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Las condiciones establecidas como óptimas para la germinación de *Prosopis sp* fueron: la escarificación de las semillas con H_2SO_4 concentrado, el uso de germinadores con agua destilada esterilizada y la utilización de la técnica ensayada en este estudio para la eliminación de microorganismos superficiales de los explantes
- La utilización de cotiledones con 0.5 cm de hipocótilo provenientes de plántulas de *Prosopis sp* de 10 días, fueron los explantes más apropiados para la inducción y el desarrollo de brotes. No obstante, los cotiledones sin hipocótilo y los cotiledones individuales, representan una alternativa de estudio por su potencial morfogénético demostrado en este trabajo.
- La mejor respuesta en la multiplicación de brotes a partir de explantes cotiledonares derivados de plántulas de 10 días se obtuvo en concentraciones de 0.05 mg/l de Kinetina. El mayor porcentaje de respuesta morfogénética en la multiplicación se obtuvo en presencia de 0.1 mg/l de ANA
- El fortalecimiento y la elongación de los brotes inducidos a partir de cotiledones con hipocótilo de plantas de 10 días se logró a través del

subcultivo continuo de los explantes originales en medios frescos sin individualizar, alternado etapas de inducción y desarrollo de brotes con los reguladores BAP y Kin con etapas de enraizamiento con la adición de IBA en el medio de cultivo.

- Se determinó que el tiempo en cada subcultivo no deberá exceder un periodo de 3 a 5 semanas, de lo contrario los explantes mostrarán senescencia de ápices y el necrosamiento de los brotes
- Se logró el 65 % de enraizamiento en brotes **individualizados** generados de cotiledones con hipocótilo con la adición de 0.1 mg/l de IBA al medio de cultivo. En brotes **no individualizados (explantes originales)** se logró desde un 43% a un 73% de enraizamiento con la formación de 1 a 6 raíces por explante a través de los subcultivos continuos en medio con los reguladores del crecimiento
- En el establecimiento de los brotes individualizados y enraizados, los resultados podrían mejorar si se llegara a contar con equipo e instalaciones con sistemas de nebulización para mantener un ambiente con elevada concentración de humedad, así como instalaciones con temperatura controlada debido a que especies recalcitrantes a propagarse como es el caso de *Prosopis* sp presentan mayor dificultad para enraizar y establecerse en condiciones *in vivo*.

- Con los ensayos realizados en este estudio se observaron algunas de las respuestas morfogénicas de *Prosopis sp* durante su cultivo *in vitro* con lo cual se han sentado algunas de las bases para la investigación futura de la problemática de la regeneración de esta especie.

8.BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, R. K. 1993. Effect of *Prosopis* species en properties of arid zone soils En *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C Tewari, N M Pasiiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis* Soc. of India. *Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India.* 27-29 pp.

Ahuja, M.R. 1991. *Biotechnology in forest trees.* Plant Research and Development. 33: 106-120 pp.

Arce, P. and Balboa, O. 1991. *Seasonality in rooting of Prosopis chilensis cuttings and in vitro micropropagation.* Forest Ecology and Management. 40 : 163-173 pp.

Arya, H. C. and Shekhawat, N. S. 1986. Clonal multiplication of tree species in the Thar Desert through tissue culture. Forest Ecology and Management 16:201-208 pp.

Bajaj, Y.P.S. 1986. *Biotechnology of tree Improvement for Rapid Propagation and Biomass Energy Production.* In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 1.* (Y.P.S. Bajaj (Ed). Springer-Verlag. Berlín.1-23 pp.

Bajaj, Y.P.S. 1991. Automate Micropropagation for mass Production of Plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 17. High-tech and Micropropagation I. Bajaj, Y.P.S. (Ed.). Springer-Verlag. Berlin 1-88 pp.

Batchelor, C.A.; Koehler, M. J. and Harris, P.J.C. 1989. *In vitro* propagation of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). *Annals des Sciences Forest.* 46: 110-112 pp.

Bidwell, R.G.S. 1990. *Fisiología Vegetal.* A.G.T. (Eds). 559-665 pp.

Buddendorf-Joosten, J.M.C. and Woltering, E.J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture.* P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J. Davis (Eds). Kluwer Academic Publishers. 165-190 pp.

Bohra, M.D. and J.C. Tewari. 1994. Response of pretreatments of germination on *Prosopis juliflora* (SW) DC. *Journal of Tropical Forestry* 10: 305-309 pp.

Burkart, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae. Subfam. Mimosoideae). *Journal of the Arnold Arboretum.* 57: 217-249 pp.

Cahitá-Cosma, D. 1991. The effect of the Nature and Origin of the explants on micropropagation In. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 17. (Bajaj, Y.P S. (Ed.). Springer-Verlag. Berlín. 143-167 pp.

Castellón, O.J. 1996. Colecta de Germoplasma de *Prosopis glandulosa* var. *Torreyana* (Mezquite dulce) en Baja California Universidad Autónoma de Baja California. 1-9 pp.

Dagar, J.C. 1993. Ecology and management of some important species of *Prosopis*. In: *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis* Soc. of India. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India. 30-39 pp.

Edwin. F. G.1993. Plant Propagation by Tissue Culture. The Technology Part I. 2° Edition. Exegetics Limited. England. 3-67 pp.

Einset, J.W. 1991. Woody Plant Micropropagation with Cytokinins. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17. Y.P.S. Bajaj (Ed) springer-Verlag, Berlín. 191-201 pp.

Emes, B. M. 1994. Flora Medicinal Indígena de México. Instituto Nacional Indigenista. Vol. I, II y III. México, D.F. 1-150 pp.

Felker, P. 1993. Review of applied aspects of *Prosopis*. In: *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh y P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India*. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India 11-15 pp.

Fisher, G. and Heilig, G.K. 1997. Population momentum and the demand on land and water resources. *Philosophical transactions of the Royal Soc. of London*. Series B 352. 869-888 pp.

García, E. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México, D.F. 71 pp.

Goyal, Y. and Arya, H.C. 1984. Tissue culture of desert trees: I. Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiol.* 115: 183-189 pp.

Harsh, L.N. and Tewari, J.C. 1993. *Prosopis* in the arid regions of India: Some important aspects of research and development. In: *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India*. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India. 5-9 pp.

Hernández, A.J.M. 1998. Obtención de cromenos (Encecalina y Desmetilencecacila) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray. Tesis de Maestría. UNAM. 31-62 pp.

Harris, P. J. C. 1992. Vegetative Propagation of *Prosopis*. In: *Prosopis* species: Aspects of their value, research and development. Dutton, R. W. (Ed.) Proceedings of the *Prosopis* Symposium. University of Durham. Cord, U D. 175-191 pp.

----- **1998.** Exploiting plants for marginal tropical areas: The Research Challenge. Profesional Lectures . School of Natural and Environmental Sciences (18): 1-27 pp.

Jordan, M. and Balboa, O. 1985. *In vitro* regeneration of *Prosopis tamarugo* Phil. and *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from nodal sections. Gartenbauwissenschaft, 50 (3).S. 138-142 pp.

Jordan, M.; Cortés, I. and Goreux, A. 1987a. Potentialities of cell and callus tissue culture to regenerate two mesquite species (*Prosopis tamarugo* and *P. chilensis*). Gartenbauwissenschaft, 52 (4). 166-169 pp.

Jordan, M. 1987b. *In vitro* culture of *Prosopis* species. En Cell and Tissue Culture in Forestry. J. M. Bonga and Don J. Durzan (Eds) Boston: Martinus Nijhoff Publ. (3): 370-384 pp.

-----, **1995.** Métodos de propagación Biotecnológicos y Convencionales de Leguminosas de Usos Múltiples para Zonas Áridas. Curso Taller sobre Técnicas Apropriadadas para la Propagación de Especies de Importancia económica para las zonas Áridas y Semiáridas de América Latina y El Caribe. FAO. 1-43 pp.

Kanzania, M. K. and Varshney A. K. 1993 . *Prosopis juliflora*- its uses. In: *Prosopis Species* in the Arid and Semi-arid Zones of India. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh y P.J.C Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India*. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India.113-115 pp.

Khan, H. A. 1993. A plant growth regulator from *Prosopis cineraria* and *Prosopis juliflora*. In: *Prosopis Species* in the Arid and Semi-arid Zones of India J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India* Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India.33-34 pp.

Killian, S.E. 1988. A study of the germinative behaviour of the seeds of some *Prosopis* species. In: The current stage of knowledge on *Prosopis juliflora*. Habit M.A. and Saavedra J.C. (Eds). FAO. 277-298 pp.

Klass, J. S.; Wright, J. and Felker, P. 1987. Influence of auxins, thiamine and fungal drenches on the rooting of *Prosopis alba* clone B₂ V₅₀ cuttings. Journal of Horticultural Science. 62(1) 97-100 pp.

----- . **1985.** Optimizing the environment for rooting cuttings of highly productive clones of *Prosopis alba* (mesquite/algarrobo). Journal of Horticultural Science. 60 (2): 275-284 pp.

Kozai, T. 1991. Acclimatization of Micropropagated Plants. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y. P. S. Bajaj (Ed.) . Berlín. (18):127-141 pp.

Martínez, O. E.; Saldívar, C. y Del Amo, S.R. 1976. "El Mezquite". Comunicado Sobre Recursos Bióticos del País. INIREB INFORMA. 6: 1-4 pp.

Meier, G. and Bovo, O. A. 1995. Cultivo *in vitro* de *Prosopis alba* Griseb (Leguminosae). REDBIO '95. 2° Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Argentina. 89 pp.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479 pp.

Nandwani D. and Ramawat, K. G. 1993. *In vitro* plantlets formation through juvenile and mature explants in *Prosopis cineraria*. Indian Journal of Experimental Biology. (31): 156-160 pp

----- **1991** Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. Indian Journal of Experimental Biology. (29): 523-527 pp.

Németh, G. 1986. Induction of rooting. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y. P. S. Bajaj (Ed.). (1): 49-64 pp.

Pérez Ponce, J.N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. 297-326 pp.

Ramawat, K.G. and Nanwani, D. 1992. Arid land afforestation by tissue culture. Bionature 11(2): 103-110 pp.

Roca, W. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Colombia. 20-39 pp.

Rzedowski, J. 1968. Las principales zonas áridas de México y su vegetación. Bios 1: 4-24 pp.

-----, 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México, D.F.
58-91 pp.

-----, 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo
Prosopis (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. Acta Botánica
Méxicana 3: 7-19 pp.

Sandys- Winsch, D.C. and Harris, P.J.C. 1991. Performance of *Acacia* and
Prosopis species at an arid site in the Republic of Cape Verde. Nitrogen
Fixing Tree Res. Reports 9: 56-58 pp.

Saunders, R. M.; Becker, D.; Meyer, E. and Torres, M.E. 1986.
Identification of commercial milling techniques to produce high sugar, high
fiber, high protein and high galactomannan fractions from *Prosopis* pod.
Forest Ecology and Management 16: 169-181 pp.

Shekhawat, N. S. 1993. Factors affecting *in vitro* clonal propagation of
Prosopis cineraria. Plant Growth Regulation 12: 273-280 pp.

Tabone, T.J; Felker, P. and Bingham, R.L. 1986. Techniques in the shoot
multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B2V50. Forest
Ecology and Management. 16: 191-200 pp.

Tewari, J. C. 1993a. *Prosopis cineraria*: pods in the human diet. In: *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India*. 125-127 pp.

Tewari, J. C. 1993b. *Prosopis Species in the Arid and Semi-arid Zones of India*. J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, Harsh and P.J.C. Harris (Eds.). *Prosopis Soc. of India. Proceedings of a Conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, Rajasthan, India*. 1-9 pp.

Toledo, V.M. and Ordóñez M. de J. 1993. The biodiversity scenario of México: A review of terrestrial habitats. In: *Biological Diversity of México, Origin and Distribution*. Ramamoorthy T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (Eds.) Oxford University Press. 757-777 pp.

Toledo, V.M. 1988. La Diversidad Biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 81: 17-30 pp.

Vibha, D. 1992. Micropropagation of nitrogen fixing trees. In: *Micropropagation of Woody Plants*. Ahuja, M. R. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. 310-315 pp.

Villanueva, D.J. 1993. Distribución actual y características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata* H. & B. Johnst), en el estado de San Luis Potosí. INIFAP. 74: 1-36 pp.

Walton, T., Harris, P. J. C. and Batchelor, C.A. 1990. Comparative rooting response of shoot tips from six *Prosopis* species. Nitrogen Fixing Tree Research Reports 8:154-155 pp.

Wilkins, Ch. P. and Dodds, J.H.. 1983. The applications of tissue culture techniques to plant genetic conservation. Sci. Prog. Oxf. 68:259-284 pp.

Yao Dun Yi; Batchelor, C.A.; Koehler, M.J. and Harris, P.J.C. 1989. *In vitro* regeneration of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*) from nodal explants. Chinese J. Bot. 1(2) 89-97 pp.

Zimmerman, R: H. 1985. Application of tissue culture propagation to woody plants. In: Tissue culture in Forestry and Agriculture. Henke, Hughes, Constantin, Hollander (Edts). Basic Life Sciences. New York. (32): 165-176 pp.

Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Micropropagation. P.C. Deberg and R.H. Zimmerman (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 45-69 pp.

10. APÉNDICE

**Medio de Cultivo
Murashige-Skoog (1962)**

STOCK	COMPUESTO	g / 20 l
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	33
Stock 1	KNO ₃	38
20 l x 400 ml	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4
	KH ₂ PO ₄	3.5
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8.8
Stock 2		
20 l x 200 ml		
Micronutrientes	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.033802
Stock 3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.172
20 l x 200 ml	H ₃ BO ₃	0.124
	KI	0.0166
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.005
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0005
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0005
Stock 4	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.556
20 l x 200 ml	Na ₂ EDTA	0.746
Vitaminas	Tiamina	0.002
Stock 5	Ac. Nicotínico	0.01
20 l x 200 ml	Piridoxina	0.01
Stock 6	Inositol	2.0
20 l x 200 ml		
Stock 7	Glicina	0.04
20 l x 200 ml		