



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación de la respuesta morfogenética in vitro de cuatro diferentes poblaciones de Picea chihuahuana Martínez, especie mexicana endémica en peligro de extinción

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ANA CLAUDIA SÁNCHEZ ESPINOSA



DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MÁNUEL CHÁVEZ ÁVILA



289039

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Comparación de la respuesta in vitro de cuatro diferentes poblaciones
de Picea chihuahuana Martínez, especie mexicana endémica en peligro de
extinción
realizado por Ana Claudia Sánchez Espinosa

con número de cuenta 9213316-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Victor Manuel Chávez Avila

Propietario

Dr. Martín Mata Rosas

Propietario

M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Suplente

Dr. Hans Martin Ricker Reymann

Suplente

Biol. Josefina Herrera Santoy

Victor Manuel Chávez Avila
Martín Mata Rosas
Juana Mabel H.
M. Ricker

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD DE BIOLÓGICAS

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Edna Maria Suarez Diaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICAS

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y con el apoyo del programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación.

Este trabajo forma parte del proyecto 27704-B del CONACyT.

DEDICATORIA

A mis padres Ernestina Espinosa Guzmán y R. Manuel Sánchez Bravo por su amor y confianza, por enseñarme y alentarme siempre hacia la superación.

A mi hermano Marco A. Sánchez Espinosa por su cariño y confianza, por alegrarme la existencia hasta en los peores momentos y porque en los momentos más felices de mi vida, siempre ha estado ahí.

A mis héroes reales, Guadalupe Guzmán y José Espinosa, mis abuelos. Porque son mi ejemplo más claro de que el esfuerzo y tenacidad rinden frutos tarde o temprano, porque me enseñaron que los momentos más difíciles de la vida pueden superarse exitosamente.

A José Luis Villarruel por compartir su vida conmigo, por ser mi apoyo más sólido, por su amor y paciencia hacia mi forma de ser, por impulsarme siempre hacia adelante, por sufrir y gozar conmigo este idilio, pero sobre todo por hacerme feliz.

AGRADECIMIENTOS

Reitero mis más sinceras gracias al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por su apoyo académico y personal en los buenos y malos momentos durante la realización de este trabajo; al Dr. Martín Mata Rosas por su coasesoría en el presente estudio; a la M. En C. Mabel Hernández Altamirano, por su apoyo académico, por su amistad, sinceridad y buenos consejos personales; a la Biól. Josefina Herrera por sus críticas constructivas hacia mi trabajo, pero sobre todo por su paciencia en la revisión de éste. Al Dr. Martín Ricker por su asesoría en el análisis estadístico de los datos; a mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos: Angel Jiménez, Katja Moebious, Rodrigo Campos, Bárbara Estrada, Rigoberto Romero, M. en C. Susana Luna. Por su amistad y sinceridad durante mi estancia en el laboratorio, porque pasamos momentos divertidos que me hicieron disfrutar cada día de trabajo; a la asociación Bosque Modelo Chihuahua A. C. en especial al Biol. Hugo Bolaños y Gustavo Heredia, por el material biológico y apoyo económico durante la última fase experimental de mi tesis, así como la información otorgada sobre la especie estudiada; al Dr. Joaquín Cifuentes y a los miembros del Laboratorio de Micología del Herbario (FCME) por su amistad y sus aportaciones académicas a mi persona durante la realización de mi servicio social. Así como a las facilidades otorgadas en la utilización de su equipo de cómputo para el escaneado de diapositivas. A la Biól. Patricia Olguín por la disección y contribución del material biológico utilizados en algunos ensayos experimentales.

A mis compañeros y amigos de generación: Cecilia, Xavier, Fernanda, Oscar y Edith, por todos esos momentos involucrados en la vida universitaria. A mis compañeros y amigos del Jardín Botánico: Esthela Sandoval, Gabriel Olalde, Teodolinda Balcázar, Martín Ilerio, Joel Rodríguez, por brindarme siempre su apoyo en los pequeños y grandes detalles cotidianos. A mis maestros y alumnos que contribuyeron a mi crecimiento académico y personal.

A mis mejores amigos Claudia Bretón y Jorge Rizo por conservar nuestra buena amistad aún en la distancia y después de tantos años. Por ser cómplices y testigos de las diferentes etapas de mi vida personal, por su apoyo incondicional.

A la familia Villarruel Ordáz por hacerme sentir un miembro de su familia y mostrarme siempre su interés y apoyo en todo momento; a mi familia, a mis tíos y primos, por hacerme sentir su +apoyo y preocupación. Por reiterarme la unidad familiar. Gracias.

INDICE GENERAL

Indice de tablas	3
Indice de figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
1. Introducción	8
1.1 Antecedentes	10
1.1.1 Cultivo de tejidos vegetales	10
1.1.2 Micropropagación de coníferas	13
1.1.3 Ubicación taxonómica y descripción morfológica de <i>Picea chihuahuana</i>	16
1.1.4 Ecología y distribución	18
1.1.5 Importancia y problemática de la especie	19
1.1.6 Estudios realizados en <i>Picea chihuahuana</i>	22
2. Objetivos	24
3. Materiales y Métodos	25
3.1 Procedencia de las semillas	25
3.2 Desinfección de las semillas	25
3.3 Inducción de brotes adventicios	27
3.4 Elongación de brotes adventicios	27
3.5 Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes adventicios	28
3.6 Análisis estadístico	31

4. Resultados	34
4.1 Inducción de brotes adventicios	35
4.2 Elongación de brotes adventicios	40
4.3 Comparación de la formación de brotes en embriones con diferentes años de colecta	41
4.4 Cultivo de embriones de cuatro poblaciones	44
4.5 Enraizamiento de brotes adventicios	49
5. Discusión	56
5.1 Inducción de brotes adventicios	57
5.2 Elongación de brotes adventicios	60
5.2.1 Oxidación	61
5.2.2 Comparación de la respuesta morfogénica de semillas de una misma población colectadas en diferentes años	63
5.2.3 Respuesta morfogénica de diferentes poblaciones	64
5.3 Enraizamiento	67
6. Conclusiones	71
7. Bibliografía	73
Apéndice	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Algunas especies de coníferas propagadas por cultivo de tejidos	15
Tabla 2 Porcentaje de respuesta al medio SH asociada a 4 poblaciones y diferentes años de colecta	36
Tabla 3 Porcentaje de oxidación <i>in vitro</i> de los embriones de las diferentes localidades y años de colecta a lo largo del tiempo	40
Tabla 4. Resultados del ANOVA realizado para la población de El Ranchito en semillas colectadas en diferentes años	42
Tabla 5. Promedio de brotes generados por embrión durante 5 meses en cultivo (SH) que fueron colectados en la población El Ranchito en dos diferentes años	43
Tabla 6. Resultados del ANOVA	44
Tabla 7. Promedio de brotes por embrión de cuatro poblaciones de <i>Picea chihuahuana</i>	46
Tabla 8. Resultados de los tratamientos para inducir enraizamiento de brotes adventicios formados a partir de embriones maduros de <i>Picea chihuahuana</i>	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del balance auxina–citocinina	12
Figura 2. Algunos aspectos de la condición actual de <i>Picea chihuahuana</i>	21
Figura 3. Ubicación geográfica de las poblaciones en estudio de <i>Picea chihuahuana</i>	26
Figura 4. Diagrama metodológico general empleado en este estudio para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Picea chihuahuana</i> a partir de embriones maduros de distintas poblaciones	29
Figura 5. Ensayos de enraizamiento empleados en este estudio	32
Figura 6. Diferencia en el tamaño de las semillas de cada población	35
Figura 7. Desarrollo morfo genético <i>in vitro</i> de embriones maduros de <i>Picea chihuahuana</i>	37
Figura 8. Diferentes formas de respuesta de algunos embriones de <i>Picea chihuahuana</i>	39
Figura 9. Porcentaje de oxidación de los embriones cultivados <i>in vitro</i> , asociada a la localidad de procedencia y al tiempo de colecta	41
Figura 10. Respuesta morfo genética <i>in vitro</i> de semillas colectadas en diferentes años dentro de una misma población después de 5 meses en cultivo	43
Figura 11. Respuesta morfo genética <i>in vitro</i> de 4 poblaciones de <i>Picea chihuahuana</i>	45
Figura 12. Comportamiento del desarrollo morfo genético <i>in vitro</i> de la población El Ranchito	46
Figura 13. Comportamiento morfo genético de <i>Picea chihuahuana</i> en la población La Tinaja	47
Figura 14. Comportamiento morfo genético de <i>Picea chihuahuana</i> en la población Las Trojas	48
Figura 15. Comportamiento morfo genético de <i>Picea chihuahuana</i> en la población de La Louisiana	49
Figura 16. Enraizamiento de brotes adventicios con pulsos de ANA durante 24 h	53
Figura 17. Enraizamiento de brotes adventicios con la técnica propuesta por Dumas <i>et al.</i> (1995)	54

ABREVIATURAS

2, 4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido α -naftalén acético
BA	Benzilaminopurina
GA	Giberelinas
GD	Medio de cultivo Gresshoff y Doy (1972)
K	Kinetina
LM	Medio de cultivo Litvay (1985)
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
PABA	Ácido P-aminobenzoico
REM	Medio de expresión de raíz
RIM	Medio de inducción de raíz
SH	Medio de cultivo Schenk y Hildebrandt (1972)

RESUMEN

Se cultivaron embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez provenientes de cuatro poblaciones del estado de Chihuahua: El Ranchito, Las Tinajas, Las Trojas y La Louisiana, para establecer y comparar su capacidad regenerativa respecto a la formación *in vitro* de brotes adventicios.

Con un periodo de inducción de 30 días en el medio Schenk y Hildebrandt (SH), kinetina 5 mg/l y sacarosa 30 g/l, se logró la formación de brotes adventicios generados principalmente en los cotiledones entre los 15 a 30 días de iniciados los cultivos.

Se encontraron diferencias significativas en el número de brotes formados para cada población. Los embriones más regenerativos fueron de la población El Ranchito, los cuales también presentaron la mayor sobrevivencia a lo largo de 5 meses. Aunque la población de La Tinaja presentó en el cuarto mes de cultivo un número alto de brotes, la mayoría de éstos murieron al quinto mes de cultivo debido a la fuerte oxidación que se presentó en los tejidos, por lo que se consolidó un bajo número de brotes.

Las poblaciones de La Louisiana y Las Trojas presentaron un bajo número de brotes regenerados y su sobrevivencia fue muy corta ya que desde los primeros meses de cultivo presentaron un problema fuerte de necrosis que fue letal para los brotes de ambas poblaciones.

Se comparó la capacidad regenerativa de embriones de la población El Ranchito colectadas en diferentes años: 1993, 1995 y 1997. Los embriones que generaron el mayor número de brotes adventicios fueron los del año 1995, superando significativamente al resto de los años y poblaciones con un tiempo de sobrevivencia mayor a lo largo de 5 meses.

El desarrollo de los brotes adventicios fue estimulado por la dilución del medio de cultivo al 50% de la concentración de sus componentes y la reducción de la concentración de sacarosa. En todas las poblaciones estudiadas se observó un lento crecimiento de los brotes generados, los cuales no llegaron a medir más de 15 mm de altura al término de 6 meses en cultivo, por lo que la reducción de sacarosa no favoreció la elongación de los brotes adventicios.

Un fuerte problema para concretar la morfogénesis en esta especie como en muchas gimnospermas fue la oxidación. Ésta ocurrió en gran medida al transferir los brotes del medio

de inducción al medio de elongación La adición de antioxidantes a los medios de cultivo y el continuo subcultivo no fueron suficientes para evitar la acumulación de compuestos fenólicos que provocan la oxidación. En varios casos el subcultivo agudizó el problema.

Los brotes adventicios no desarrollaron raíces de manera espontánea, por lo que se llevaron a cabo seis tratamientos para la inducción de raíz, de los cuales sólo 4 promovieron la formación de raíz. Se logró inducir el enraizamiento con pulsos de 24 h de ANA 4 mg/l (1 brote), 5 mg/l (1 brote) y 6 mg/l (2 brotes) en medio SH al 50% con sacarosa 15 g/l. La primera observación del crecimiento de las raíces se observó a los 4 días en medio SH 50% y sacarosa 30 g/l.

Más eficiente aún fue el desarrollo de raíces en 7 brotes con el método de Dumas y Monteuris (1995), en el que se empleó el medio RIM (Medio de inducción de raíz) con 1 mg/l de ANA durante 3 semanas. El desarrollo de las raíces ocurrió en el medio REM (medio de expresión de raíz) al término de 12 días.

Aunque el número de plantulas logradas es bajo, hasta el momento es el único trabajo *in vitro* de esta especie en el que los tratamientos han generado resultados consistentes. Los resultados aquí obtenidos son alentadores para lograr llegar al establecimiento de un protocolo efectivo para la micropropagación de esta especie mexicana en peligro de extinción.

1. INTRODUCCIÓN

México tiene una alta diversidad biológica, de las mayores en el mundo, pero a pesar de esta gran riqueza vegetal, poco se conoce sobre sus especies, fundamentalmente en lo que a su biología, cultivo, manejo y conservación se refiere, lo que repercute en gran medida en una falta de conocimiento acerca de su importancia para los ecosistemas y para el país.

Generalmente es aceptado que los bosques han sido fuertemente explotados a una mayor rapidez que su regeneración natural o artificial, además, los rápidos y desastrosos efectos de enfermedades, pestes e incendios colocan en mayor riesgo la existencia de ciertas especies de árboles. Aunado a la problemática natural de los bosques está la presión del hombre, ya que la diversidad y extensión de los bosques del mundo están declinando conforme aumenta la población humana. (Thorpe *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1993).

En México ocurre un rápido deterioro ecológico en todos los ecosistemas. La reducción de las zonas boscosas no sólo es afectada por la explotación legal y clandestina de madera, también por la extensión de terrenos de cultivo y pastoreo, teniendo un impacto inmediato en el ecosistema y la tasa de reforestación de los bosques. La conservación por medio del uso sustentable de nuestros recursos, es una meta urgente para frenar el grave riesgo de extinción que enfrentan numerosas especies, sin embargo, es uno de los países más atrasados en conservación de recursos naturales.

Desde hace varios años las técnicas biotecnológicas de propagación *in vitro* se han mostrado como una alternativa efectiva para la propagación de plantas con problemas particulares en su reproducción, así como, para la conservación de recursos genéticos (Frankel *et al.*, 1995). El término cultivo de tejidos o cultivo *in vitro* se define como el proceso de reproducción asexual usando técnicas artificiales, en donde el tejido o explante se desarrolla bajo condiciones asépticas y factores ambientales controlados como la luz y la temperatura, y de balances nutricionales que promuevan la morfogénesis de los explantes, proceso basado en

el fenómeno de la totipotencialidad de las células (Aitken-Cristie *et al.*, 1981; Villalobos y Thorpe, 1985)

El interés de propagar *in vitro* especies arbóreas está basado en las ventajas en tiempo y manejo del material biológico, dado que estas especies generalmente presentan largos ciclos de vida desde la siembra de las semillas hasta la floración, los cuales disminuyen al emplearse estas técnicas. Más aún, estos largos periodos han hecho muy difícil la aplicación de la genética convencional en el mejoramiento de estas especies.

Desde hace varios años, se han venido realizando diversas investigaciones sobre el establecimiento y manejo de plantaciones, con el objeto de generar los conocimientos y técnicas necesarias para el cultivo de especies forestales con interés biológico y económico.

El género *Picea*, se conoce actualmente sólo en los estados de Nuevo León, Durango y Chihuahua (Rzedowski, 1978), existen 3 especies en México, *Picea mexicana* Martínez, *Picea martinezii* T. F. Patt. y *Picea chihuahuana* Martínez, esta última especie se encuentra en estado relictual y sólo en pocas localidades de la Sierra Madre de Chihuahua y de Durango, en las cuales crece en lugares particularmente protegidos y reducidos, esto la ha llevado a ser una especie en peligro de extinción. Actualmente en el estado de Chihuahua, la Asociación Bosque Modelo, A. C. lleva a cabo la germinación de semillas de *Picea chihuahuana* en vivero para su posterior reintroducción al hábitat silvestre. Sin embargo, sólo han obtenido aproximadamente el 50% de germinación y un bajo porcentaje de sobrevivencia por lo que requiere el empleo de otras técnicas que hagan posible su propagación rápida y masiva en periodos cortos.

Debido a la importancia biológica que esta especie representa, el presente trabajo pretende aportar conocimientos en la búsqueda de otras alternativas para la conservación de esta especie relictual.

1.1 ANTECEDENTES

La conservación biológica representa asegurar el mantenimiento, la sobrevivencia y reproducción natural de las especies. Hay dos formas básicas para tratar de conservar la biodiversidad vegetal: 1) en reservas de la naturaleza (*in situ*): pretende la preservación de la biodiversidad de las especies vegetales en la naturaleza, de forma que puedan reproducirse naturalmente continuando el proceso evolutivo de las plantas y asegurando la conservación de las complejas interacciones entre plantas, animales y su biosfera. 2) A través de colecciones (*ex situ*), que comprende o agrupa la conservación en jardines botánicos, bancos de semillas y por cultivos de tejidos.

1.1.1 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

La propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo (totipotencialidad). Para que la célula pueda expresar este potencial *in vitro*, es necesario que se le proporcionen las condiciones ambientales adecuadas, utilizando principalmente medios nutritivos de composición definida y condiciones asépticas en todas las etapas de cultivo.

El cultivo de tejidos vegetales ha permitido el avance tanto de la ciencia básica como la aplicada y en los últimos años ha significado una parte esencial en los logros de la biotecnología.

Entre los beneficios del cultivo de tejidos se encuentra la micropropagación, mediante la cual es posible lograr una producción clonal, rápida, masiva y libre de patógenos (Beverdors, 1990). La regeneración de plantas se puede alcanzar a través de dos vías morfogénicas: 1) Organogénesis y 2) Embriogénesis somática.

1) Organogénesis: Es el proceso de iniciación y desarrollo de una estructura, la cual, muestra formación de órganos y funciones naturales; la iniciación de los cuales esta temporalmente separada de la iniciación de otros órganos. El nuevo brote es una estructura

unipolar y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen, cada órgano puede ser adventicio o *de novo* en su origen. Las bases de la organogénesis son poco entendidas y envuelven una variedad de factores como: crecimiento de la planta donadora, tipo y estado fisiológico del explante, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, condiciones ambientales y época del año en la que se realiza el cultivo.

La organogénesis es regulada por la relación de auxina:citocinina (reguladores de crecimiento), la fuente de carbohidratos suplementada y las condiciones ambientales (Tran Thanh Van *et al.*, 1974; Tran Thanh Van y Trinh, 1978).

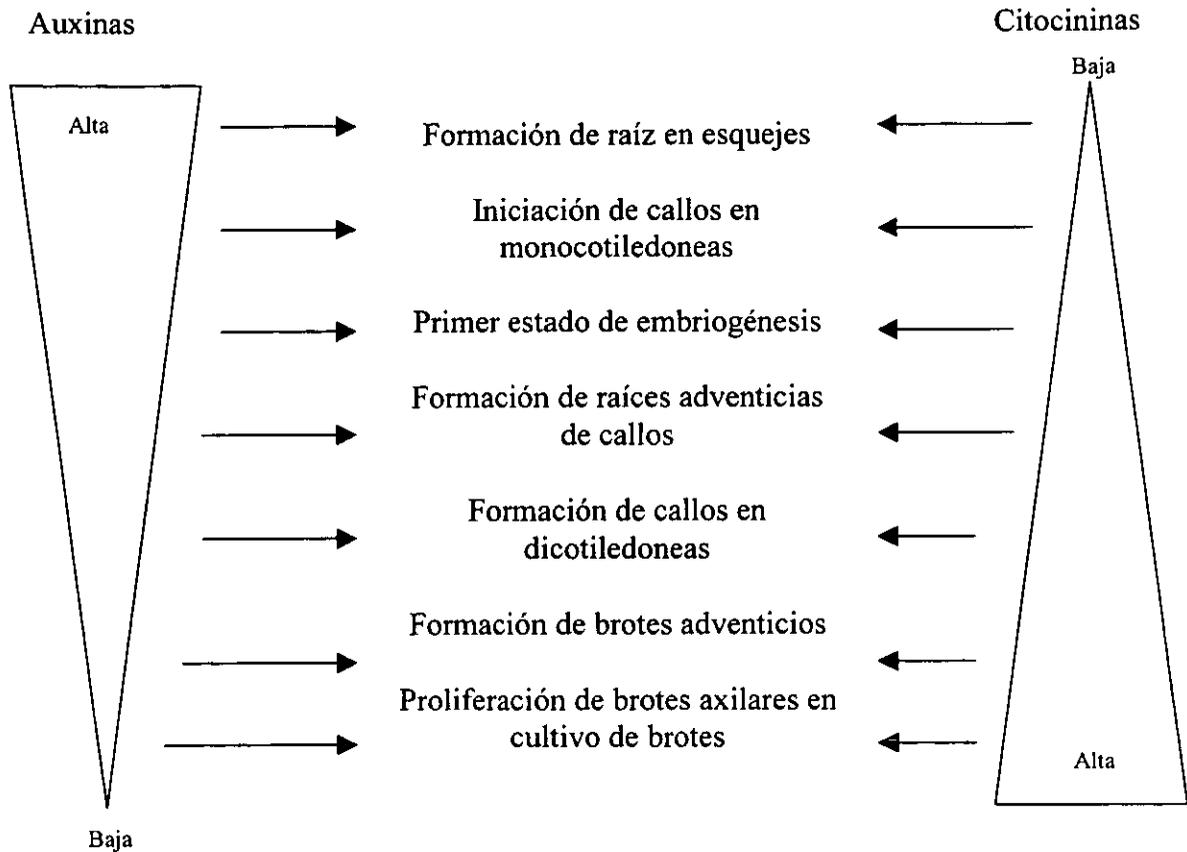
Los estudios de Skoog y Miller (1957) demostraron la importancia del balance exógeno auxina:citocinina. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina comúnmente favorece la formación de raíces, mientras una proporción baja favorece la formación de yemas. El balance realmente efectivo debe lograrse en el interior de los tejidos (Figura 1).

Varias partes de una planta pueden tener diferentes respuestas a las mismas condiciones de cultivo, tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la planta donadora (Tran Thanh Van, 1980), asimismo la variación en la respuesta de los explantes pertenecientes a la misma especie vegetal puede ser considerable (Murashige, 1974).

La organogénesis puede llevarse a cabo de forma indirecta o directa:

a) Organogénesis indirecta (a partir de callo): El callo es una masa amorfa que pierde su arreglo parenquimático surgiendo de la proliferación celular del explante cultivado. Una de las características más importantes del callo es que es capaz de desarrollar raíces, tallos y embrioides que pueden formar plantas normales, además de ser usado en el cultivo de células en suspensión.

Figura 1. Efecto del balance auxina – citocinina. Tomado de George (1993).



b) **Organogénesis directa:** durante muchos años se han conocido métodos mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemos adventicios llevan rápidamente este proceso de regeneración.

2) **Embriogénesis Somática o Asexual**, se refiere a la producción de embriones a partir de células somáticas. Los embriones somáticos no son producto de la fusión de gametos, son estructuras bipolares, semejantes a los cigóticos, cuyos tejidos vasculares no están unidos a los del tejido original. La embriogénesis somática puede ser muy útil en micropropagación y en

algunos aspectos es más ventajosa al compararla con la organogénesis. Las plantas formadas a partir de embriones somáticos tienen un sistema radicular original que generalmente es superior a las raíces adventicias y evita el serio problema de inducir enraizamiento (por ejemplo en coníferas, Mohammed y Vidaver, 1988).

El cultivo de tejidos vegetales ha sido empleado en el área de la conservación y aprovechamiento forestal y se han tenido grandes avances en la conservación, propagación y mejoramiento de las especies utilizadas por el hombre. Esto ha tenido un mayor alcance en las angiospermas, en tanto que en las gimnospermas, caracterizadas por muy largos ciclos de desarrollo y menor expresión de su capacidad morfogénica, los logros han sido menores o inexistentes con aquellas especies silvestres que hasta ahora han tenido un aprovechamiento regional y no se han estudiado o se les han dedicado estudios limitados.

Dentro de las especies mexicanas en peligro de extinción que requieren otros métodos de conservación se encuentra *Picea chihuahuana*, esta especie endémica y relictual ha sido poco estudiada desde su descubrimiento, a pesar de la importancia biológica que representa y que es descrita en los siguientes capítulos.

1.1.2 Micropropagación de coníferas

El cultivo de tejidos aplicado a especies forestales ha tenido una difícil trayectoria dados los ciclos biológicos presentados por las coníferas. De acuerdo con Ball (1950) la diferenciación de yemas a partir de callos cultivados de *Sequoia sempervirens* (Lamb.) no fue exitosa porque las yemas nunca formaron brotes. En la década de los 60's, el cultivo de coníferas se benefició con las investigaciones relacionadas con los requerimientos nutritivos de los tejidos *in vitro* hechas en otras especies y con el enriquecimiento de los medios de cultivo. La primera conífera diferenciada *in vitro* fue la especie *Pinus palustris* producida por Brown en 1974 a partir de yemas adventicias formadas en cotiledones (Dodds y Roberts, 1999). Huhtinen (1972), obtuvo callos al cultivar megagametofitos haploides de *Picea abies* (L.)

Karst. y a partir de éstos, se logró la diferenciación de raíces; posteriormente logró la obtención de brotes.

Actualmente se ha logrado la micropropagación de diferentes especies de coníferas mediante la embriogénesis somática, de hecho es la mejor forma de propagación por cultivo de tejidos ya que la formación del embrión evita la difícil tarea del enraizamiento en brotes adventicios o axilares. Los trabajos de cultivo *in vitro* de coníferas están principalmente enfocados a la embriogénesis somática aunque esta técnica aún presenta una etapa crítica; la maduración de los embriones, la cual resulta problemática en general en gimnospermas.

La formación de coníferas *in vitro* por organogénesis (Tabla 1) se puede dividir convencionalmente en cuatro etapas (Villalobos *et al.*, 1983):

1) Iniciación de las yemas. Típicamente, el tejido seleccionado se siembra en un medio de cultivo con alto contenido de sales minerales, como el de Murashige y Skoog (MS), o también el de Schenk y Hildebrandt (SH) y se complementa con citocininas (0.5-30 μM).

2) El paso de las yemas a brotes. En muchos casos, la formación de brotes a partir de primordios de yemas, requiere del trasplante a otro medio de cultivo con diferente equilibrio nutritivo u hormonal. Cuando los brotes se han diferenciado, el trasplante permite la individualización y podría facilitar el enraizamiento. La disminución en 50% de los macro y micronutrientes que constituyen los medios de cultivo, se ha empleado con cierto éxito (Thorpe y Harry, 1991).

3) Enraizamiento de los brotes. Esta es la etapa más limitante en la micropropagación de gimnospermas (Zel, 1993). Generalmente se intenta el enraizamiento iniciando con la reducción de contenido de sales en el medio de cultivo, de la sacarosa (0.5-1%), del régimen de temperatura (aproximadamente 20°C) y del mantenimiento de los tejidos en oscuridad durante los primeros diez días del tratamiento. El AIB suele utilizarse en concentraciones de 0.1 a 10 mg/l o en combinación con otras auxinas. Una vez que el primordio radical se ha diferenciado, los brotes se deben trasplantar a un medio sin reguladores de crecimiento para permitir que ocurra la elongación de las raíces.

Tabla 1. Algunas especies de coníferas propagadas por cultivo de tejidos.

Especie	Explante	Reguladores del crecimiento utilizados (μM)	Respuesta Morfogenética	Referencia
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Embriones, Cotiledones Braquiblastos	BA (0.5-25)	B. a.	Travan (1979); Von Arnold y Erikson (1981); Zel (1993); Bormman (1984)
	Ápices de plántulas	BA (625)	B. ax.	
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco.	Cotiledones	BA (5) + ANA (0.5 – 5) o BA (5) + AIA o AIB (0.25 – 5)	B. a.	Cheng (1977)
	Embriones maduros		B. a.	Montes-Rivera (1993)
<i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous.	Yemas, embriones y megagametofitos	ANA / BA (1-5 / 0.5-1)	B. a.	Galindo – Flores (1996) García- Campusano (1999)
<i>Larix olgensis</i>	Meristemos y tejido juvenil	Zeatina + kinetina + AIA	B. a.	Ewald (1998)
<i>Picea omorika</i> (Planc.)	Embriones	MS + BA (10), ANA (0.05), AIB (0.05)	B. a.	Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric (1995)
<i>Picea sitchensis</i> (Bong.) Carr.	Cotiledones	MS + BA (400)	B. a.	Drake, <i>et al.</i> (1997)
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss.		BM + BA	Em. S.	Attree <i>et al.</i> (1991)
<i>Larix leptolepis</i> Hort. Ex End.	Embriones inmaduros	LM + 2,4-D + BA	Em. S.	Wook Kim <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus pinaster</i> Sol. ex Ait.	Cotiledones	GMD + BA	B. a.	Calixto y Pais (1997)
<i>Pinus heldreichii</i> Crist.	Embriones	GD + BA (4.40)	B. a.	Stojicic <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Embriones	BA + K	B. a.	Harry y Thorpe (1994)

B. a. = brotación adventicia; B. ax. = brotes axilares; Em. S.= embriogénesis somática.

El enraizamiento en especies de coníferas sigue siendo uno de los principales

El enraizamiento en especies de coníferas sigue siendo uno de los principales problemas a los que se enfrenta esta técnica, son pocos los trabajos de propagación en coníferas que reportan enraizamiento *in vitro*. Comúnmente se utiliza ácido indól butírico (AIB) para inducir enraizamiento en coníferas y en menor proporción se utiliza ácido α naftalén acético (ANA), estos reguladores del crecimiento se aplican por pulsos de altas concentraciones y lapsos cortos (24 - 48 h) en medio líquido o en dosis menores durante el cultivo en medios gelificados.

Se ha logrado enraizar coníferas mediante diferentes tratamientos, por ejemplo *Picea sitchensis* se logró enraizar mediante pulsos con citocinina (Drake *et al.*, 1997); con *Pinus pinaster* se utilizó un medio de inducción del enraizamiento (RIM) descrito en 1982 por Rancillac *et al.* (1982) y con AIB por Calixto y Pais (1997), *Picea omorika* presentó enraizamiento espontáneo (Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric (1995).

4) Transplante a suelo. Debe existir un equilibrio razonable entre el tallo y la raíz, la planta debe mantenerse en una transición gradual de humedad hasta las condiciones de invernadero, deben eliminarse completamente los restos de agar y deben mantenerse sombreadas especialmente durante la transición de las condiciones de laboratorio al semillero.

1.1.3 Ubicación taxonómica y descripción morfológica de *Picea chihuahuana* Martínez

La ubicación taxonómica (Cronquis, 1991)

Reino: Vegetal

División: Pinophyta

Clase: Coniferopsida

Orden: Coniferales

Familia: Pinaceae

Género: *Picea*

Especie: *Picea chihuahuana*

Martínez en 1942 describió a esta especie como un árbol de 25-30 m de altura, por 45-60 cm de diámetro, de copa piramidal, con ramas inferiores casi horizontales y las superiores

erguidas (Figura 2A). Ramillas ásperas y opuestas. Corteza agrietada, de color grisáceo. Yemas terminales ovoideo-obtusas, con brácteas redondeado-ovadas y ciliadas, en cuya base se observan otras pequeñas largamente acuminadas (Figura 2B).

Hojas solitarias, lineares, cuadrangulares, comúnmente de 17 a 19 mm por 1.7 mm de ancho, rígidas, rectas o ligeramente encorvadas, articuladas sobre bases decurrentes y salientes, de color verde claro glauco, con el extremo agudo córneo y punzante de 1 a 2 mm.

Como inflorescencia masculina presenta un pequeño cono, cilíndrico u oblongo-cilíndrico, de 3 cm de largo, de color violáceo. Constan de numerosas anteras con dos sacos poliníferos, colocados en espiral y su conectivo se engancha en la extremidad figurando una escama. Los conos femeninos se presentan terminales o subterminales, colgantes, solitarios o colocados en espirales en torno al eje por pares o en grupos de tres, rara vez cuatro, a veces levemente encorvados, romos, de 10.5 a 12 cm de largo por 4 cm de diámetro (abiertos), de color café amarillento, brillantes, con pedúnculos de 10 mm. Escamas numerosas (aproximadamente 150 incluyendo una veintena de pequeñas e infértiles que pertenecen al ápice y a la base del cono), delgadas y persistentes, imbricadas, coriáceo-leñosas, ovoides, de borde redondeado y entero, de 20 mm de largo por 17-19 mm de ancho y llevan una bráctea dorsal de 4 a 5 mm, irregularmente oval, de color castaño brillante, con el borde rosado, gruesamente lacinado (Figura 2C).

Semilla pequeña, elíptica, subangulosa, atenuada en la base, color pardo oscuro, de 4 a 5 mm con ala casi oval, de 15 a 17 mm de largo por 3.5 mm de ancho para la semilla con ala, de color amarillento a veces ligeramente rosado, provista de ganchos que sujetan la semilla (Figura 2D).

La albura y el duramen de la madera son de color blanco, sin brillo, olor o sabor característicos presenta una textura fina, homogénea, de grano derecho y veteado tenue. En primavera la madera presenta coloración más clara y un grosor mayor que en el verano en el cual es de color negro.

1.1.4 Ecología y distribución

Picea chihuahuana está restringida a localidades poco comunes en elevaciones que van desde los 2,300 hasta los 3,200 msnm, en las montañas de la Sierra Madre Occidental de Chihuahua en la región de la Alta Tarahumara (Zona Prioritaria de Conservación No. 43) y Durango.

Las poblaciones conocidas son pequeñas y el rango va desde un árbol hasta 100 o más en algunas localidades. Las poblaciones están separadas desde 40-320 km., y su área total cubre sólo un par de kilómetros cuando en otras especies de *Picea* cubren 480 km. (Sánchez, 1996).

Picea chihuahuana fue aparentemente un componente regular o abundante en el Pleistoceno. Se ha encontrado una cama de polen fósil en el Lago de Texcoco, el cual es ahora parte de la Ciudad de México y en el lago de Chalco, lo que ha indicado que habitó en estas regiones hasta el término del Pleistoceno (Clisby y Sears, 1955 citado por Ledig, 1997), actualmente ocupa zonas de la Sierra Madre Occidental. Su ambiente actual es frío, húmedo y no está expuesto a vientos secos. En estas zonas la masa boscosa asociada a *Picea chihuahuana* esta compuesta de *Pinus arizonica* Engelm, *Pinus engelmannii* Carr., *Pinus durangensis* Martínez y *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw y *Populus tremuloides* Michx. así como *Pseudotsuga* spp., *Abies* spp., *Cupressus* spp.

La proximidad de las localidades con el Trópico de Cáncer les da un clima de luz poco común para el género *Picea*, en el día las montañas son claras y cálidas, mientras que después de la tarde son húmedas y frías. La duración de la luz varía de 13 a 14 horas comparado con 14 a 17 horas en los bosques del norte y 15.5 a 18 horas en los bosques boreales.

No hay una variación morfológica de población a población, se han sugerido dos posibilidades para explicar la pérdida de agresividad regenerativa de *Picea chihuahuana*: la degradación del biotipo, resultado de la restricción geográfica a lo largo del tiempo y el hecho de que este ambiente sea actualmente un nicho especializado (Stebbins y Major 1965 en Gordon 1968).

Se conoce su distribución limitada la cual se da en sólo 35 localidades en un rango de 800 km² en los estados de Chihuahua y Durango, la población de *Picea chihuahuana* más pequeña en el estado de Chihuahua cuenta con tan solo un individuo y la más grande con 2241. Solamente tres tienen más de 1000 individuos maduros y en conjunto con las localidades de Durango no llegan a pasar los 20,000 individuos (Ledig *et al.*, 1997).

1.1.5 Importancia y problemática de la especie

Su importancia radica en la cubierta vegetal que proporciona a otras especies vegetales de importancia medicinal (por ejemplo chuchupate, matarique), además de crear condiciones ideales para refugio de fauna; evita la erosión de las pendientes inclinadas en donde crece.

Para los Rarámuris esta especie es importante ya que le dan usos religiosos como la fabricación de violines para sus actos ceremoniales y es su fuente de madera para diversas actividades.

Actualmente *Picea chihuahuana* no es de interés económico por su madera, sin embargo en Europa y América del Norte algunas especies de este género sí tienen un amplio uso forestal. Ya que *Picea* es un género de mayor importancia en la industria maderera, la especie relictual *Picea chihuahuana* después de haber habitado múltiples regiones, debe ser una fuente de variabilidad genética de gran valor biotecnológico.

Se ha observado su falta de regeneración en parte por su distribución heterogénea de edades en las poblaciones, su situación se agudiza ya que casi la totalidad de los árboles son adultos y llegarán a ser seniles, perdiendo la capacidad regenerativa de la especie. Otra causa de su falta de regeneración es que sus conos son parasitados por larvas de *Cydia phyllisi* Miller, que se alimentan de las semillas, ocasionando que no exista repoblación de *Picea* y sólo existan árboles adultos en algunas poblaciones, teniendo una baja producción de semillas (menos del 20%), por lo que es necesario que se implementen medidas para controlar el ataque de estos insectos (Figura 2E). También los géneros *Alternaria* spp. y *Nigrospora* spp. (hongos

ficomisetos) ocasionan fuertes daños en las poblaciones de *Picea* (Figura 2F) (Gordon 1968; Sánchez y Narváez, 1990).

Lamentablemente las poblaciones de *Picea chihuahuana* se han reducido en los últimos años por distintos factores: se han provocado incendios para distraer la atención y extraer madera en forma ilegal, se utilizan las puntas de los árboles como arbolitos de navidad (Figura 2G). Además, la extensión de la ganadería como sustento económico en la región ha perturbado gravemente sus poblaciones impidiendo el desarrollo de las plántulas. Su reproducción por semillas se da cada dos años.

Picea chihuahuana muestra actualmente un empobrecimiento genético a consecuencia de un prolongado aislamiento originado por las barreras geográficas existentes entre las poblaciones, una alta especialización de su nicho ecológico y una baja agresividad de la regeneración natural con respecto a las especies con las que cohabita (Gordon, 1968; Sánchez y Narváez, 1983; Narváez *et al.*, 1983; Rzedowski *et al.*, 1977). La combinación de estos factores ha provocado que *Picea chihuahuana* se encuentre en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2000; IUCN, 1998).

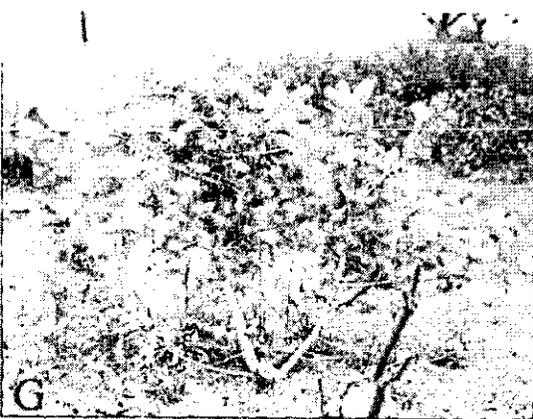
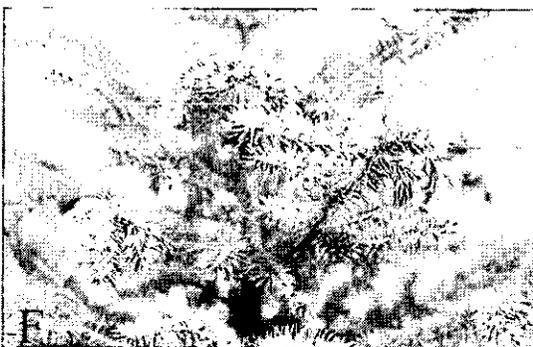
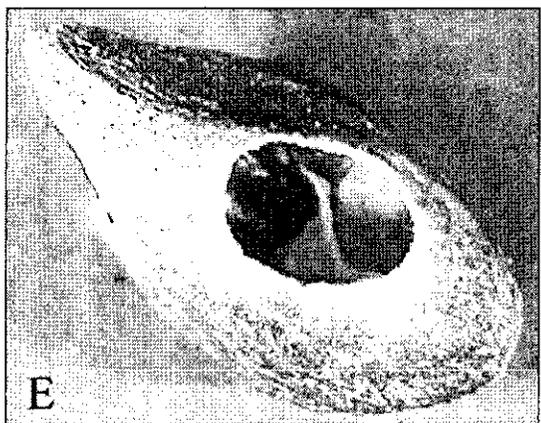
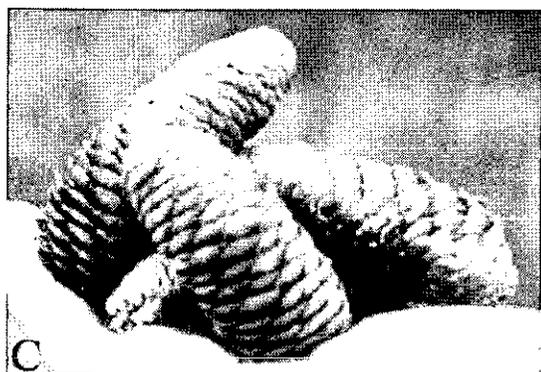


Figura 2. Algunos aspectos de la condición actual de *Picea chihuahuana*. A: hábitat. B: ramas terminales. C: conos femeninos. D: semillas. E: semilla depredada por *Cydia phyllisi*. F: ramas parasitadas por hongos. G: árbol despuntado.

1.1.6 Estudios realizados en *Picea chihuahuana*

Las investigaciones realizadas en torno a esta especie endémica son escasas, los trabajos reportados son enfocados a taxonomía, ecología, genética de poblaciones y recientemente en regeneración *in vitro* por diversos métodos.

Se pueden citar varios trabajos:

Martínez (1942) publicó la descripción taxonómica de la especie y la reportó en esa época como una nueva especie del género para México.

Gordon (1968) hizo un estudio ecológico de *Picea chihuahuana* y describió las condiciones ambientales, físicas y químicas de su ecosistema, así como las interacciones con otras especies vegetales.

Chaparro (1992) determinó algunas condiciones para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Picea chihuahuana*. Reportó la formación de callo a partir de acículas y utilizó el medio MS para promover el desarrollo de plántulas a partir de embriones maduros.

Montes-Rivera (1993) realizó una guía metodológica para el cultivo *in vitro* de *Picea chihuahuana* en el que reporta como medio de inducción de brotes el MS adicionado con una combinación de ANA/BA; como medio de elongación reportó el MS al 50% de sus componentes y libre de reguladores del crecimiento. Asimismo reportó el medio de enraizamiento GD (Gressof y Doy) al 50% de sus componentes, adicionado con una combinación de AB:AIB:BA (1:1:0.5) reportó enraizamiento a las 15 semanas.

Jacob (1994) realizó estudios isoenzimáticos de las poblaciones de esta especie, determinó la variación genética de 11 poblaciones y estimó las distancias genéticas por medio de la comparación de la variación intra e inter poblacional.

Sánchez (1996) publicó un folleto técnico en el que determinó áreas potenciales para la propagación de esta especie, mediante un estudio utilizando el Sistema de Información Geográfica para detectar áreas con hábitat actual y potencial de dicha conífera. Uno de los resultados importantes de este estudio fue la localización de una nueva población de *Picea chihuahuana*, que actualmente solo cuenta con un ejemplar.

Ledig *et al.* (1997) realizaron estudios de evolución y divergencia entre poblaciones de *Picea chihuahuana* analizando su heterocigotidad y los efectos del cambio climático desde el Holoceno.

En un reporte interno del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) realizado por Ortega (1997) se reporta el comportamiento de varias poblaciones ubicadas dentro del área de influencia de Bosque Modelo A. C., el autor básicamente realizó estudios morfológicos de la semilla, germinación y desarrollo de plántulas.

Mata (2000) describió la morfogénesis *in vitro* a partir de embriones inmaduros y para las condiciones ensayadas estableció el mejor medio de inducción de brotes adventicios, además realizó estudios fisiológicos de los brotes generados.

López-Escamilla (2000) realizó estudios histológicos de la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros y estableció tiempos de exposición a los reguladores del crecimiento requeridos para lograr la inducción de brotes.

No obstante estos logros aún falta solucionar el grave problema de la oxidación de los cultivos *in vitro* y el enraizamiento de los brotes. Una respuesta a esta problemática permitiría basar la conservación de *Picea chihuahuana* en una metodología confiable para su micropropagación de las distintas poblaciones de esta especie mexicana.

2. OBJETIVOS

- Inducir respuestas morfogénicas (brotes y raíces) *in vitro* a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*.
- Determinar si existen diferencias en el número de brotes producidos en el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Picea chihuahuana* provenientes de distintas poblaciones y diferentes tiempos de colecta.
- Promover el enraizamiento de los brotes adventicios formados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Procedencia de las semillas

Las semillas utilizadas a lo largo de esta investigación procedieron de poblaciones de *Picea chihuahuana* ubicadas en la Sierra Tarahumara en el estado de Chihuahua, las cuales fueron proporcionadas por Bosque Modelo Chihuahua, A. C. Las poblaciones analizadas fueron; El Ranchito, Las Trojas, La Tinaja y La Louisiana (Figura 3), las semillas fueron colectadas en el año de 1997, también se usaron semillas de la población El Ranchito colectadas en los años de 1993, 1995 y 1997.

3.2 Desinfección de las semillas

Las semillas maduras se extrajeron de conos cerrados. En todos los casos las semillas fueron tratadas de la siguiente manera (Figura 4):

- 1) Se enjuagaron con agua destilada en agitación 20 min. con el fin de eliminar polvo y partículas adheridas.

- 2) Se mantuvieron 24 horas en una solución de Captán (2.5 g/l) con microbicida comercial Mycrodin (plata coloidal 0.32%) 3 gotas/100 ml. Se transfirieron a alcohol etílico al 70% por 2 minutos y se desinfectaron con blanqueador comercial (hipoclorito de sodio 6% de cloro activo) al 30% (v/v) adicionado con Tween 80 (3 gotas/100 ml), se mantuvieron por 30 minutos en agitación.

- 3) Bajo condiciones asépticas (en campana de flujo laminar) se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

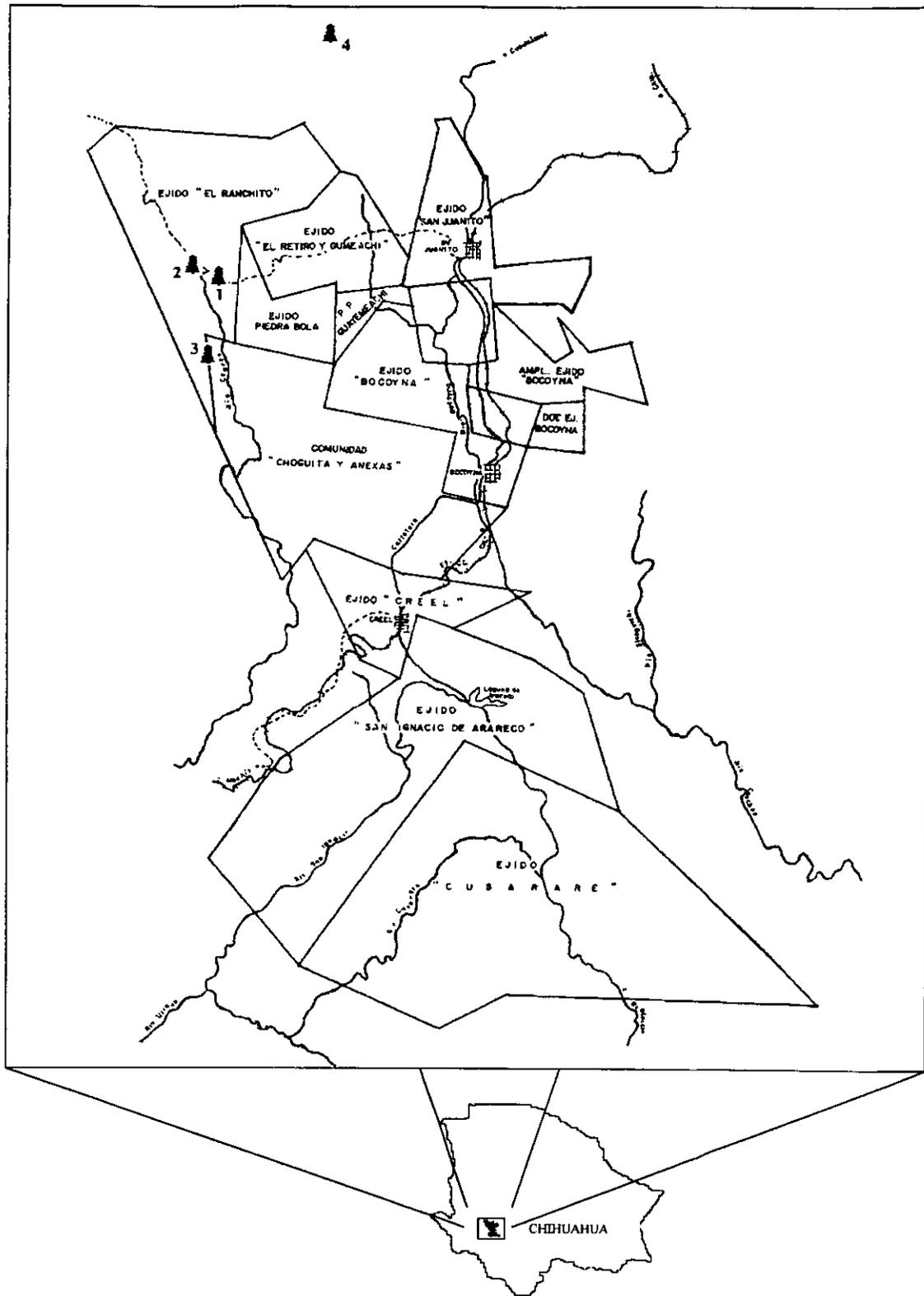


Figura 3. Ubicación de las localidades de estudio. 1: El Ranchito, 2: La Tinaja, 3: Las Trojas, 4: La Louisiana.

3.3 Inducción de brotes adventicios

Se utilizó la metodología descrita por Mata (2000), para la inducción de brotes adventicios, la cual se detalla a continuación:

En completa asepsia se disectaron las semillas mediante la ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumental de disección. Se retiró la testa; el megagametofito se cortó longitudinalmente en dos partes y se extrajo el embrión completo.

Los embriones se sembraron en frascos Gerber de 120 ml de capacidad que contenía 20–25 ml de medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) (Apéndice 1) adicionado con Kinetina 5 mg/l, 10 embriones por frasco. El pH fue ajustado a 5.7 – 5.75 con NaOH y HCl 0.1N previo a la adición de agar 8 g/l, los embriones se incubaron en este medio durante 30 días (Figura 4).

Todos los frascos de cultivo con medio nutritivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C, 1.5 kg/cm² psi⁻¹ durante 17 minutos previos a su utilización.

3.4 Elongación de brotes adventicios

Con el fin de promover la morfogénesis, los embriones se subcultivaron en medio SH al 50% de todos sus componentes incluyendo la sacarosa (15 g/l). Estos cultivos se establecieron en caja de Petri (10x100 mm) para facilitar el conteo y la toma de fotografías de los brotes.

Cada 7 días se rotaron los embriones dentro de la misma caja petri en medio donde no había embriones previamente, para evitar la acumulación de sustancias que pudieran causar oxidación de los embriones y se realizaron subcultivos quincenales para promover el crecimiento (elongación) de los brotes que se originaron. Después de dos subcultivos en SH 50% la sacarosa se disminuyó a 10 g/l para promover una mayor elongación de los brotes (Mata, 2000) (Figura 4). Los brotes se mantuvieron en medio SH 50% sacarosa 10 g/l durante los meses siguientes hasta que alcanzaran una altura de 5-10 mm para ser individualizados y someterlos posteriormente a los diferentes tratamientos para la inducción de raíz.

A los medios tanto de inducción como de elongación se les adicionaron ácido ascórbico

y ácido cítrico 250 mg/l de cada uno para disminuir la oxidación.

A los 60 días de siembra se inició el conteo individual de brotes, cada embrión fue identificado con un número y el conteo se realizó cada 25-30 días. Los brotes contados fueron sólo los que presentaron coloración verde, los brotes necrosados no se tomaron en cuenta ya que se observó que al ser necrosado el tejido, éste perdió su forma haciendo imposible distinguir si era un brote o no, observándose sólo como una masa oscura y amorfa. Se llevaron a cabo cuatro contéos.

Los cultivos de inducción y elongación se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h de luz.

3.5 Enraizamiento *in vitro* de brotes adventicios

Al término de 5 meses después de iniciados los cultivos, los brotes adventicios de mayor altura (0.5 a 1cm) regenerados *in vitro* se individualizaron realizando un corte diagonal en su base y se sometieron a diferentes ensayos de enraizamiento.

Se realizaron 6 ensayos de enraizamiento basados en lo reportado en la bibliografía para coníferas:

1) Pulsos de auxinas durante 24 y 48 h en medio líquido SH 50% mas 15 g/l de sacarosa que se mantuvo en agitación. Los tratamientos probados fueron: ANA 5 y 10 mg/l, AIB 5 y 10 mg/l y AIA 5 y 10 mg/l.

Por la falta de elongación de los brotes sólo se contó con 3 brotes por tratamiento. Después del pulso con auxinas, los brotes tratados se transfirieron a medio SH 50% con 15 g de sacarosa y se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de obscuridad (Figura 5).

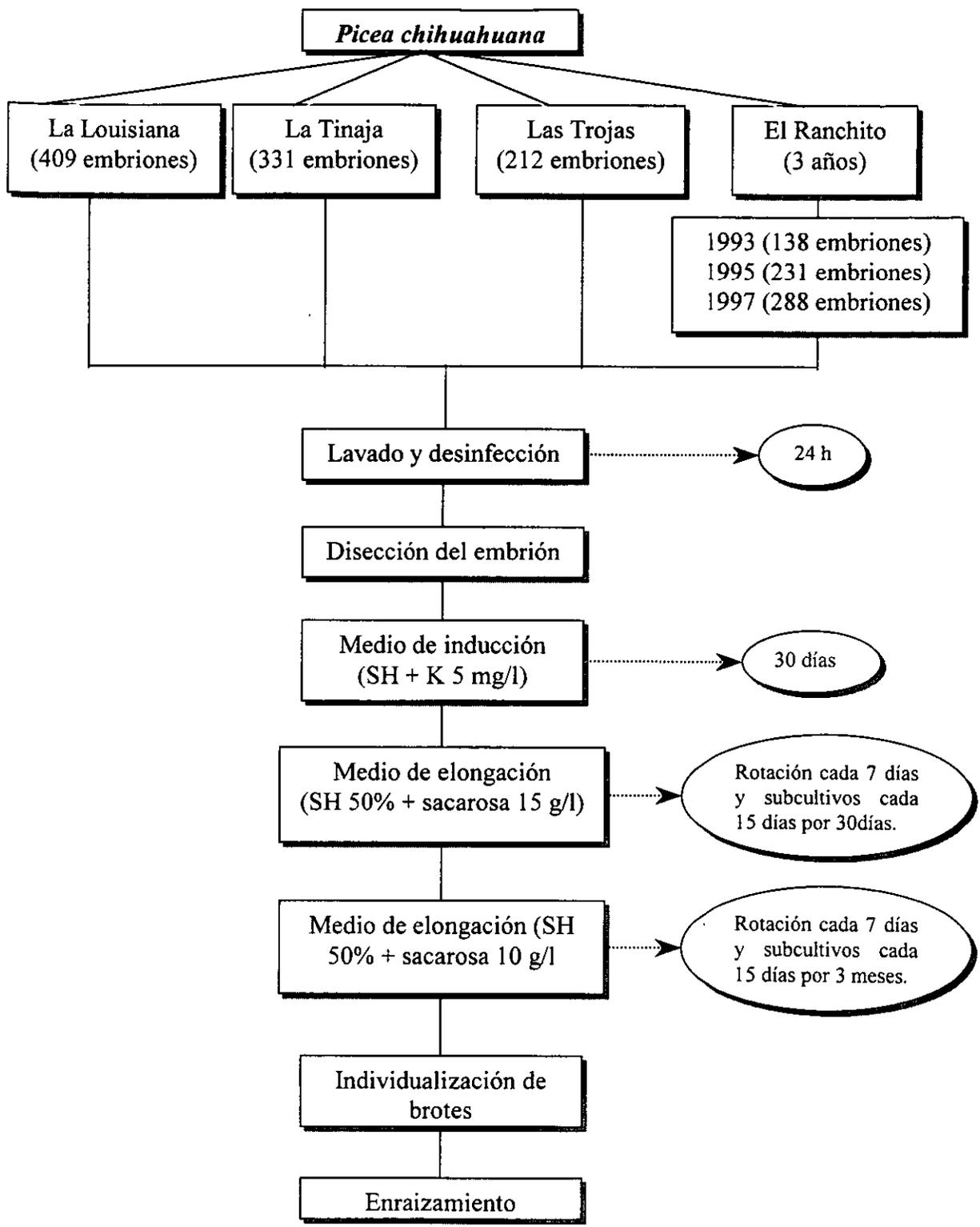


Figura 4. Diagrama metodológico general empleado en este estudio para la regeneración *in vitro* de *Picea chihuahuana* a partir de embriones maduros de distintas poblaciones.

2) Tres lotes de 15 brotes se sometieron a SH 50% más sacarosa 15 g/l, pH 5.7 con 4, 5 ó 6 mg/l de ANA durante 24 h. Transcurridas las 24 horas se subcultivaron en medio SH 50% más sacarosa 30 g/l, libre de reguladores de crecimiento (Figura 5).

3) Se siguió la metodología propuesta por Dumas y Monteauris (1995) para el enraizamiento de *Pinus pinaster* Ait. 19 brotes se sometieron al tratamiento y se usó el medio de inducción de raíz (RIM) adicionado con ANA 1 mg/l, pH 5.5. Después de tres semanas se subcultivaron en medio de expresión de raíz (REM) adicionado con sacarosa 30 g/l, carbón activado 2 g/l y sin reguladores del crecimiento (Figura 5).

4) Método de Montes (1993) para *Picea chihuahuana*, se utilizaron 15 brotes y se usó el medio SH al 50% más sacarosa 20 g/l, carbón activado 1 g/l, ácido abscísico 0.1 mg/l, AIB 1 mg/l y BA 0.5 mg/l. Montes (1993) reportó que obtuvo enraizamiento en 15 semanas. Los brotes que logró enraizar se sacaron de este medio y se transfirieron a una mezcla de sustrato esterilizado de Peat Moss y Agrolita 1:1, regado con agua destilada esterilizada.

5) La metodología de Harry *et al.* (1995) para *Juniperus cedrus* Webb & Berth., propone un tratamiento con una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1), humedecida con 20-25 ml $\frac{1}{4}$ SH sacarosa 10 g/l, y ANA 0.93 mg/l pH 5.0, se sometieron al tratamiento 15 brotes en el presente estudio durante 5 meses.

6) Otro lote de 15 brotes adventicios se sometió al tratamiento de enraizamiento para coníferas propuesto por la Ing. Agrónoma Irma Sánchez del Colegio de Posgraduados que consiste en medio MS líquido adicionado con AIB 10 mg/l durante 72 h, al término de este tratamiento se subcultivaron al medio SH de elongación, el cual consistió de medio SH con macronutrientes y micronutrientes al 50%, vitaminas, hierro e inositol al 100% y sacarosa 20 g/l (Figura 5).

Aunque los autores de los tratamientos 4 y 5 reportaron diferentes medios para el enraizamiento, se decidió utilizar el mismo medio en el que aquí han sido desarrollados los brotes (SH). Dado que el número de brotes por tratamientos no es significativo

estadísticamente, la evaluación de los diferentes tratamientos se llevó a cabo por presencia o ausencia de raíz.

Los ensayos 2 al 6 se mantuvieron a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16 h de luz.

3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) mediante la ayuda del paquete estadístico SYSTAT 7.0 para comparar las respuestas morfogénicas de las diferentes poblaciones de *Picea chihuahuana* estudiadas. Se trabajó con un nivel significativo del 95%, el rechazo o la aceptación de la hipótesis nula (no existe diferencia significativa) se determinó mediante la probabilidad de p, es decir, si la $p \geq 0.05$ no hay diferencia significativa. En donde se establecieron diferencias significativas se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey.

Como variable se tomó el número de brotes formados por embrión en el cultivo. Dado que se trató de datos de conteo y con valores de cero, se realizó la transformación de datos mediante la suma de 0.5 a cada valor y se aplicó raíz cuadrada a cada uno para correr el análisis estadístico y se tomó en cuenta el valor de cero (Sokal y Rohlf, 1995). Los datos reportados son la reconversión de los valores analizados, elevando el valor al cuadrado y restando 0.5, por lo que no son valores aritméticos.

Se llevaron a cabo dos ANOVA con dos factores el primero fue de 4 poblaciones y el segundo tres tiempos de colecta en una misma población. El primer diseño (poblaciones) contenía un alto número de repeticiones de cultivo, siendo 2555 el número total de datos analizados. En el segundo ANOVA se analizaron 1268 datos. En ambos ANOVAS el número de repeticiones no fue completamente balanceado, esto debido a que el comportamiento de los embriones no fue homogéneo Posteriormente se llevó a cabo una comparación no planeada de los promedios en pares con el método de Tukey, usando una vez más SYSTAT 7.0. (Sokal y Rohlf, 1995).

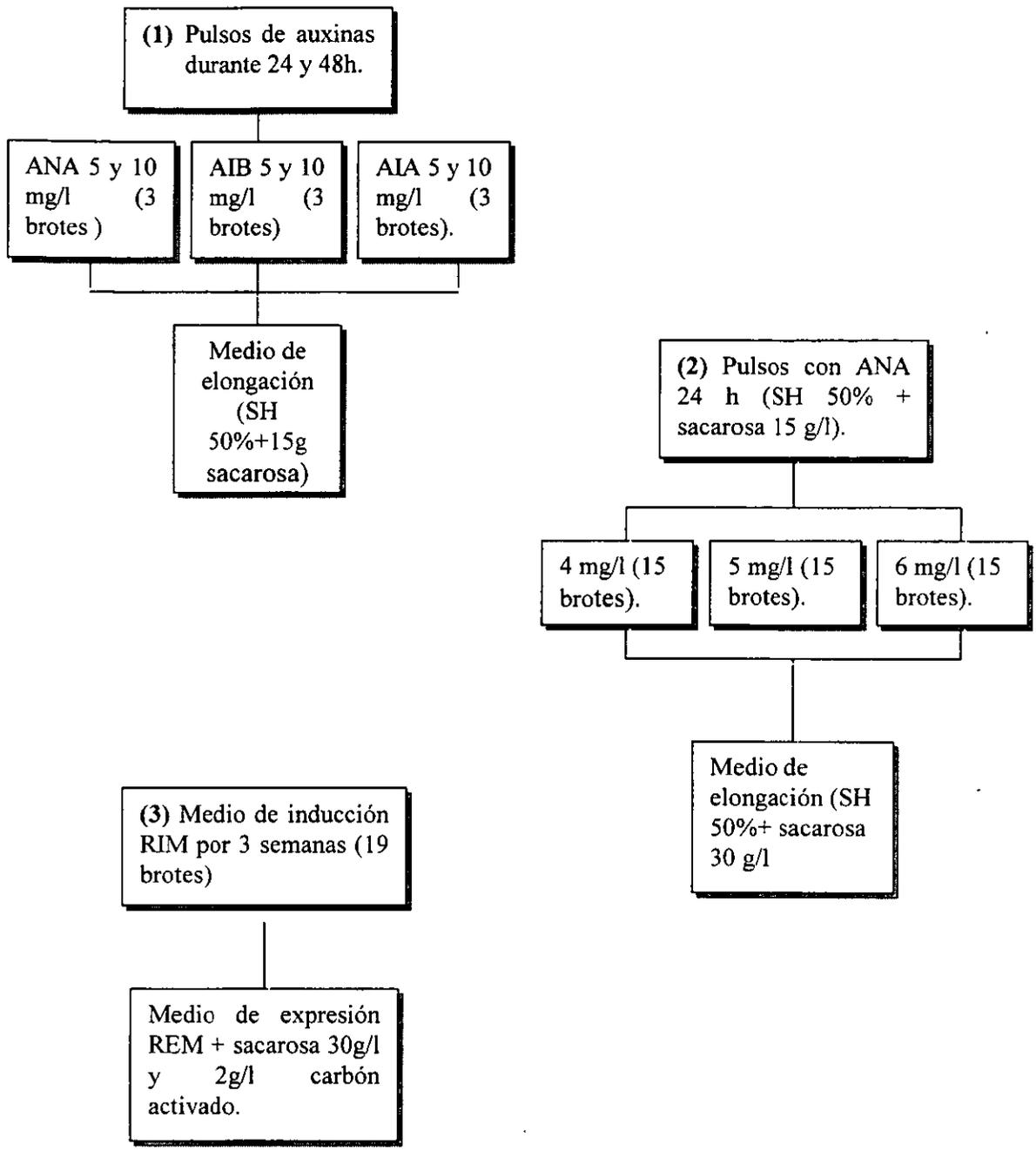


Figura 5. Ensayos de enraizamiento empleados en este estudio. Los brotes utilizados tenían 5 meses y su talla era de entre 0.5-15 mm. Condiciones de cultivo; (1): $25 \pm 2^\circ\text{C}$. (2): $22 \pm 1^\circ\text{C}$ pH 5.5 y N (3): $22 \pm 1^\circ\text{C}$ pH 5.7.

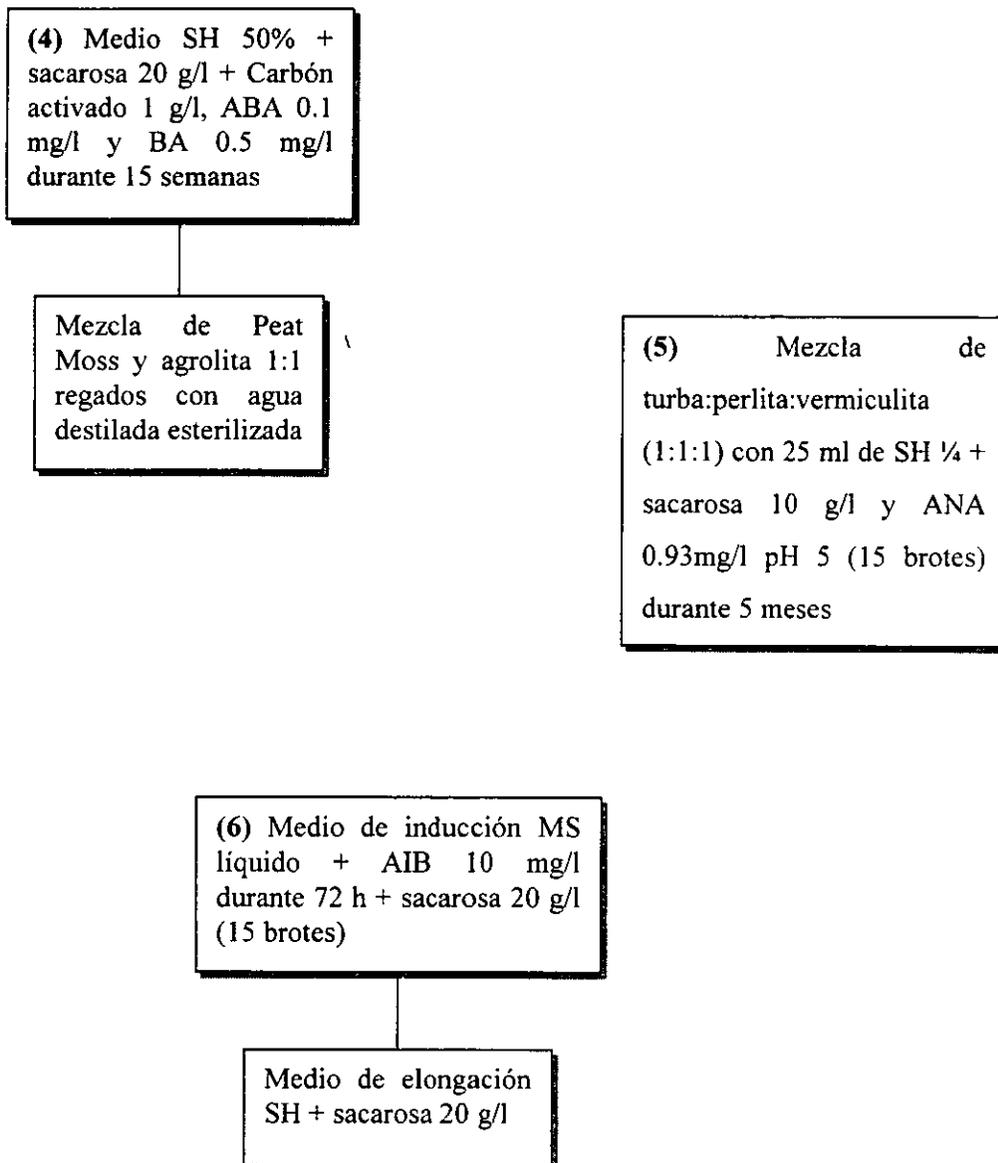


Figura 5 (continuación). Condiciones de cultivo: (4), (5) y (6). $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. RESULTADOS

Es bien conocido que la capacidad morfogénica de los explantes, en este caso embriones, se encuentra fuertemente ligada a factores intrínsecos de los mismos, como la edad y el estado fisiológico de la planta madre. Con el objetivo de establecer si hay diferencias significativas en la respuesta morfogénica entre las poblaciones estudiadas, los embriones de cada población se mantuvieron separados y se observaron diferentes respuestas al medio de inducción y formación de brotes, así como en su desarrollo en el medio de elongación y su posterior enraizamiento.

Las primeras observaciones hechas en este estudio fueron las características físicas de las semillas de las diferentes poblaciones, en las que se observaron diferencias en tamaño principalmente y características físicas del embrión, las cuales son descritas a continuación:

Las semillas provenientes de la población de Las Trojas (Figura 6), tenían un tamaño de 1 a 3 mm, inferior al resto de las poblaciones, por lo que tuvieron que ser tamizadas, seleccionándose las de mayor tamaño. Estas semillas al ser sometidas al tratamiento de desinfección por 24 h, muchas de ellas quedaron suspendidas en el agua y al ser disectadas se encontraron vanas, disminuyendo considerablemente la disponibilidad de material biológico. Los embriones que se lograron disectar tuvieron una buena respuesta al medio de inducción, estos embriones tenían un color blanco-crema y consistencia firme.

En la población de La Louisiana, las semillas se observaron sanas y presentaron un tamaño de 5-6 mm (Figura 6) pero al ser disectadas, el embrión se observó muy pequeño y en algunos casos con una consistencia suave y de color amarillento.

Las semillas de El Ranchito y La Tinaja, ambas con tamaños de semilla de entre 5-6 mm (Figura 6) se observaron en su mayoría sanas con el embrión de color blanco-crema, de consistencia dura y compacta al ser disectado. Esta condición se vio reflejada en el número de embriones que respondieron al tratamiento, ya que fueron los que mejor respondieron al medio de inducción.

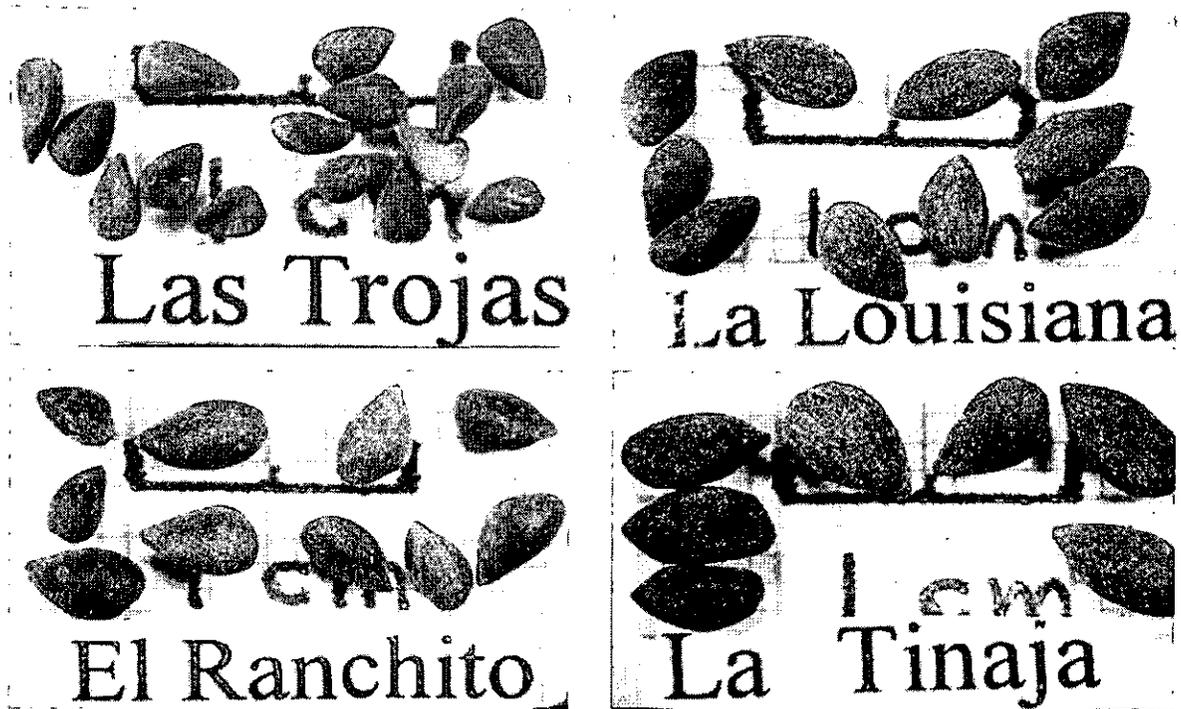


Figura 6. Diferencia en el tamaño de las semillas de cada población. La escala presentada equivale a 1 cm y la cuadrícula equivale a 1mm.

4.1 Inducción de brotes adventicios

En términos generales se logró la inducción de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* con el medio SH adicionado con kinetina 5 mg/l y sacarosa 30 g/l durante un periodo de inducción de 30 días. Entre las poblaciones se encontraron diferencias en la respuesta al medio de inducción que son mostradas en la tabla 2. Los embriones de todas las localidades en estudio respondieron de forma favorable al medio de inducción, en esta etapa la oxidación no se presentó en la mayoría de los embriones aún cuando no fueron tratados con antioxidantes antes de la siembra.

Tabla 2. Porcentaje de respuesta al medio SH asociada a 4 poblaciones y diferentes años de colecta, después de un mes de incubación a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en medio de inducción.

Localidad	# Embriones Sembrados	# Embriones con Respuesta	% De respuesta
El Ranchito 1993	138	51	36.95
El Ranchito 1995	231	154	66.6
El Ranchito 1997	288	225	78.12
La Louisiana 1997	409	137	33.4
Las Trojas 1997	212	149	70.2
La Tinaja 1997	331	294	88.82

La inducción de los brotes adventicios a partir de embriones maduros en el medio de inducción es descrita a continuación:

La formación de los brotes adventicios fue por organogénesis directa; en la superficie de los cotiledones y escasamente sobre el hipocótilo. En la primera semana de inducción, el hipocótilo se tornó de un color rojizo, seguido por el hinchamiento de los cotiledones y la curvatura cóncava del embrión respecto a la superficie del medio (Figura 7 A-B). Entre los 15 y 30 días se dio la aparición de meristemoides, los cuales dieron apariencia nodular al tejido y derivaron en primordios de brote (ápices meristemáticos con primordios foliares); posteriormente se incrementaron y se consolidaron en la etapa de proliferación (Figura 7 C-E). A los 60 días esos nódulos se habían diferenciado en primordios de brotes (Figura 7 D-E).

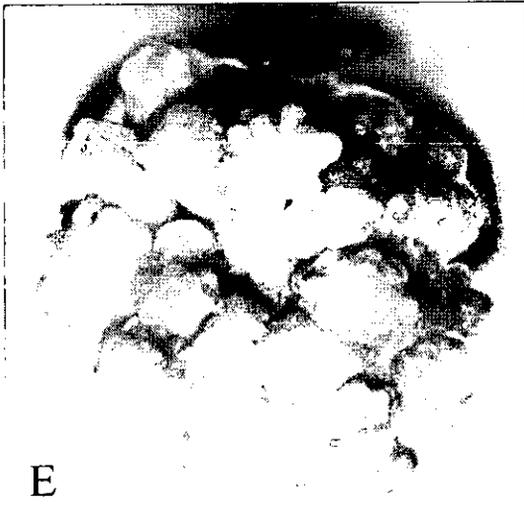
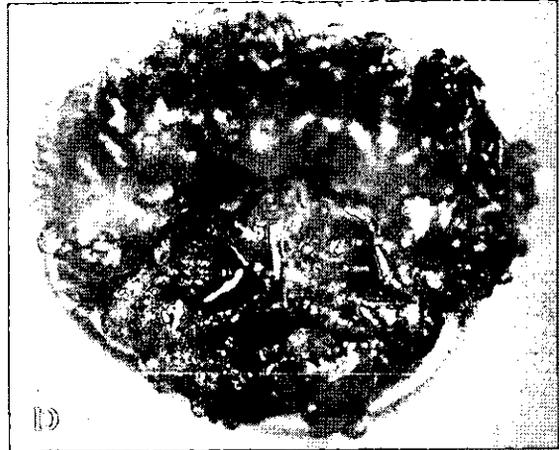


Figura 7. Desarrollo morfológico *in vitro* de embriones maduros de *Picea chihuahuana*. A: embrión con 8 días en medio de inducción. B: embrión con 15 días de inducción. C: embrión con 30 días de inducción. D: embrión con 40 días de cultivo. E: embrión a los 60 días de cultivo (medio de elongación). F: brotes adventicios a los 4 meses de cultivo. G: brote individualizado a los 6 meses de cultivo.

La consolidación de la mayoría de los brotes se dio entre 50-80 días. El hipocótilo no presentó crecimiento ni cambios notables salvo algunas excepciones cuando se tornó café oscuro pero sin crecimiento, a los 30 días se observó oscurecimiento de esta zona.

Dentro de los embriones de una misma población se observaron diferentes formas de respuesta en las que los embriones sólo presentaron hinchamiento sin apariencia nodular (Figura 8 A-E). También se observó que en algunos embriones no todos los cotiledones respondieron de la misma forma, en algunos casos sólo respondió la mitad del embrión y la otra mitad se hinchó y posteriormente se necrosó. En otros casos algunos cotiledones aumentaron su longitud y posteriormente se necrosaron sin formación de brotes.

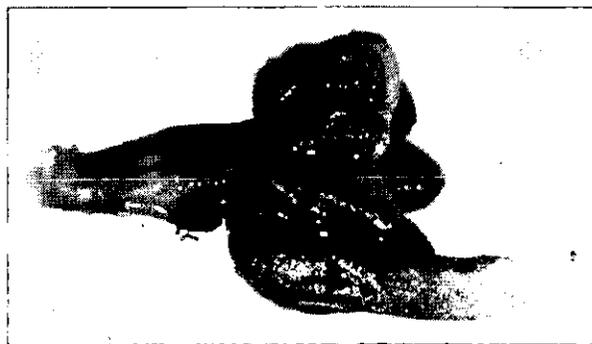
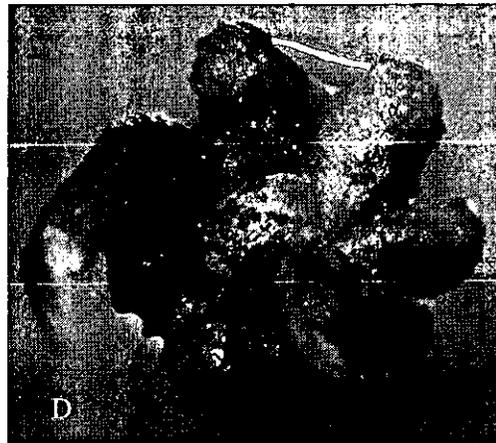
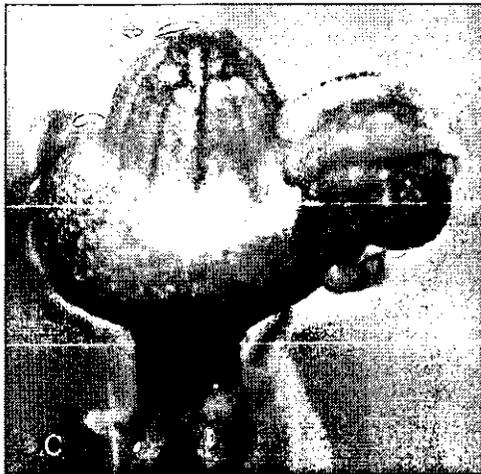
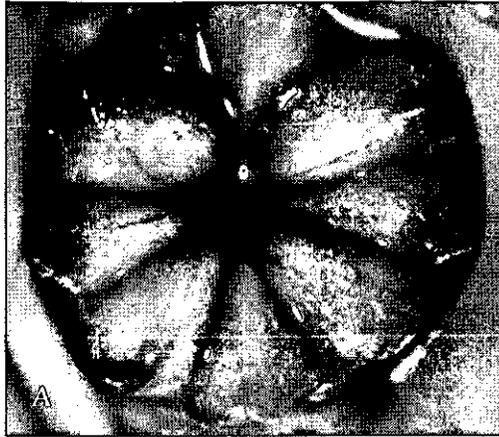


Figura 8. Diferentes formas de respuesta de algunos embriones de *Picea chihuahuana*. A y B: hinchamiento de los cotiledones sin formación de brotes. C: brotación adventicia a partir del hipocótilo. D y E: elongación de cotiledones sin brotación adventicia.

4.2 Elongación de brotes adventicios

Para la elongación de brotes adventicios de *Picea chihuahuana* se utilizó la dilución del medio y la reducción de la concentración de sacarosa a 15 g/l durante 30 días y posteriormente se redujo nuevamente a 10 g/l. Se observó sin embargo, un lento crecimiento de los brotes generados, los cuales no llegaron a medir más de 15 mm de altura al cabo de 5 meses de cultivo (Figura 7 F-G).

Uno de los principales problemas para concretar la morfogénesis a partir de los embriones de *Picea chihuahuana* fue la oxidación, que resultó letal a lo largo de todo el desarrollo. Se adicionó al medio de cultivo una solución antioxidante, y los embriones fueron rotados en el medio y subcultivados cada 15 días para evitar la acumulación de compuestos tóxicos que pudieran ser causantes de la oxidación del tejido. Sin embargo, esto no fue suficiente para evitar la oxidación. Los subcultivos continuos fueron un factor estresante para los explantes ya que se observó que los brotes con una altura mayor de 10 mm, al ser subcultivados, presentaron marchitez en los ápices y su color se tornó verde pálido o amarillento, cuando los brotes se mantuvieron en el mismo medio de cultivo después de 45-60 días se desarrollaron nuevas hojas y su color fue verde brillante sin rastros de oxidación.

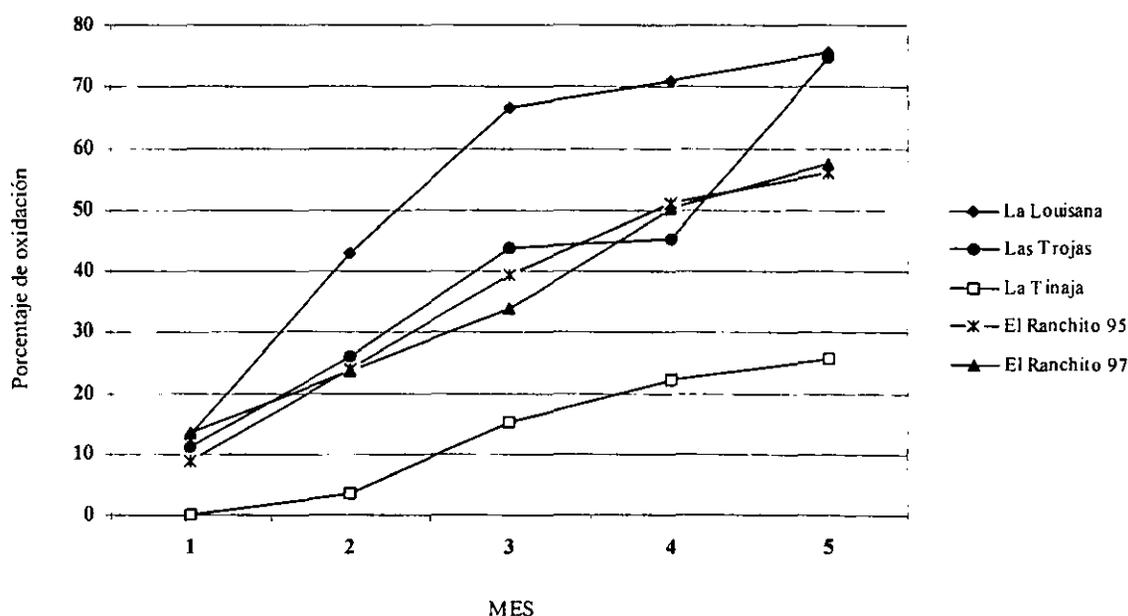
Se observó que la oxidación afectó a todas las poblaciones y aumentó a lo largo del tiempo (Tabla 3). A su vez la consolidación de los brotes disminuyó y no se observaron cambios notables en su crecimiento después del tercer mes de cultivo.

Tabla 3. Porcentaje de oxidación *in vitro* del número total de embriones de las diferentes localidades y años de colecta a lo largo del tiempo.

	MES				
	1	2	3	4	5
LOCALIDAD					
La Louisiana 1997	13.19	43.05	66.66	70.83	75.69
Las Trojas 1997	11.11	25.92	43.7	45.18	74.81
La Tinaja 1997	0	3.57	15.25	22.07	25.64
El Ranchito 1997	13.3	23.64	33.99	50.24	57.63
El Ranchito 1995	8.64	24.07	39.5	51.23	56.17

La oxidación se presentó en forma muy extensa en los embriones de la mayoría de las poblaciones a partir de la transferencia de los embriones al medio de elongación, acentuándose entre el tercer y cuarto mes de cultivo. En los casos de La Louisiana y Las Trojas se acentuó entre el segundo y tercer mes de cultivo alcanzando hasta un 67% (Figura 9), el desarrollo de brotes cesó y los brotes formados empezaron a morir a partir del tercer mes de cultivo en las poblaciones mas afectadas. En la población de El Ranchito en general se observó un patrón similar de oxidación tanto en la semilla colectada en el año 1995 como en la colectada el año 1997 aunque no fue tan grave, ésta se presentó en la mitad de los embriones en cultivo sin embargo no fue letal para estos lotes. La población de La Tinaja presentó un porcentaje menor de oxidación con mayor sobrevivencia de los brotes generados sin un aumento considerable después de 5 meses en cultivo.

Figura 9. Porcentaje de oxidación de los embriones cultivados *in vitro* asociada a la localidad de procedencia y al tiempo de colecta



4.3 Comparación de la formación de brotes en embriones con diferentes años de colecta

Para determinar si la respuesta morfogénica variaba en semillas de una población colectadas en diferentes años, se utilizaron semillas de El Ranchito de los años 1993, 1995 y

1997 utilizando la metodología antes descrita para inducción y elongación de brotes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Las semillas colectadas en el año 1993 parecieron perder su capacidad de respuesta en un periodo relativamente corto. En un ensayo preliminar, con una metodología diferente a la presentada en este trabajo con estas semillas, se observó una respuesta favorable a la inducción de brotes, pero al llevarse a cabo el experimento para la comparación de respuesta de los diferentes años con la metodología modificada, las semillas tuvieron una respuesta muy baja a la inducción y al subcultivarse al medio de elongación presentaron necrosis en su mayoría, impidiendo la consolidación de los brotes y causando la muerte de los embriones con respuesta, esto hizo imposible el conteo y seguimiento del desarrollo. La falta de material biológico para establecer nuevos ensayos impidió un nuevo establecimiento de lotes que hubiera permitido esclarecer si esa falta de respuesta fue debida a la edad de las semillas o al cambio de condiciones de cultivo.

Las semillas de los años 1995 y 1997 respondieron de forma favorable al tratamiento y se observaron diferencias en el desarrollo de sus brotes.

Los resultados del análisis de varianza mostrados en la tabla 4 corroboraron una diferencia significativa en el número de brotes además de observarse diferencias en el desarrollo de estos.

Tabla 4. Resultados del ANOVA realizado para la población de El Ranchito en semillas colectadas en diferentes años. Datos analizados después de 6 meses en cultivo.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F	P
Año	2.60396E+02	1	2.60396E+02	1.65881E+02	0.000000000
Mes	6.97195E+01	3	2.32398E+01	1.48045E+01	0.000000002
Año x mes	2.783969785	3	0.927989928	0.591159499	0.620842325
Error	1.97792E+03	1260	1.569779272		

Los embriones de las semillas colectadas en el año 1995 tuvieron una mayor respuesta a la inducción de brotes al cuarto mes de cultivo (Figura 10), originando un promedio máximo

de 7.93 brotes por embrión a los 4 meses de cultivo contra 3.54 brotes por embrión de las semillas colectadas en el año 1997 (Tabla 5).

Figura 10. Respuesta morfogénica *in vitro* de semillas colectadas en diferentes años dentro de una misma población después de 5 meses en cultivo. (promedio \pm un error estándar).

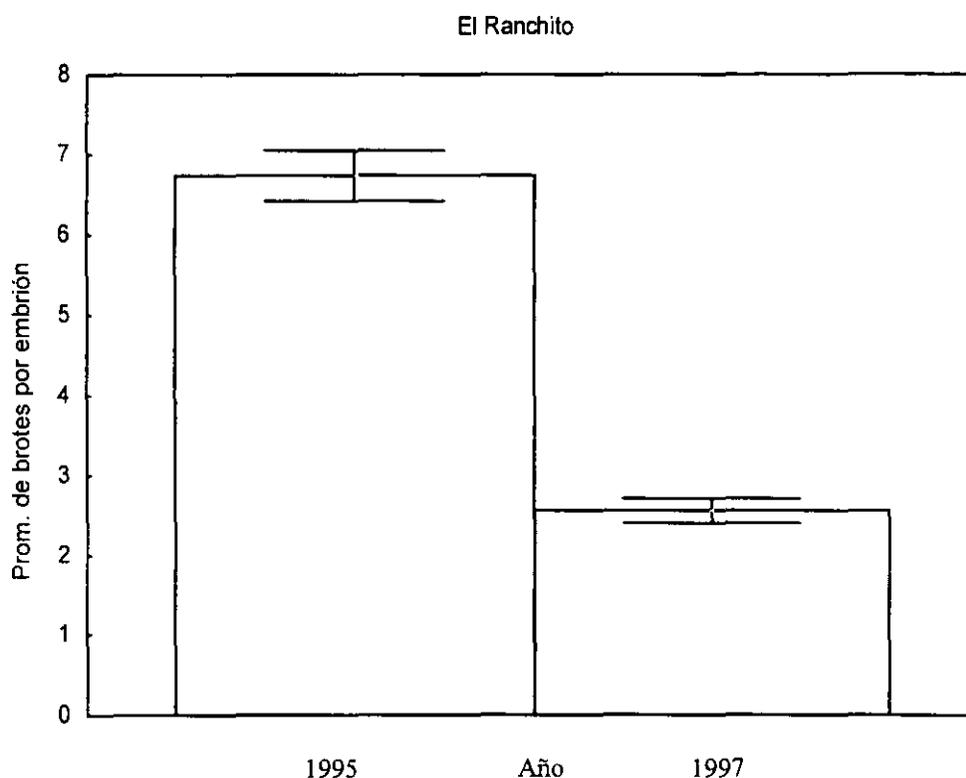


Tabla 5. Promedio de brotes generados por embrión de la población El Ranchito en dos diferentes años durante 5 meses en cultivo en medio SH.

	Evaluación Mensual				
	1	2	3	4	5
Año de colecta					
1995	0	5.17	7.51	7.93	6.48
1997	0	1.11	3.24	3.54	2.65

Los brotes generados por embriones de 1995 tuvieron un buen desarrollo mostrando un color verde cenizo y numerosas acículas además de alcanzar mayor talla (1-2 cm), además se

observó menor oxidación en comparación con las semillas del año 1997 (Figura 9).

Los brotes generados por las semillas colectadas en el año 1997 presentaron un buen desarrollo pero inferior al de las semillas del año 1995 además de una menor elongación, su aspecto verde cenizo y su consistencia rígida.

4.4 Cultivo de embriones de cuatro poblaciones

Al cultivar *in vitro* embriones de distintas poblaciones de *Picea chihuahuana* de semillas colectadas en el año 1997, se observó una respuesta diferencial.

Los resultados del ANOVA son mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados del ANOVA de las diferentes poblaciones estudiadas realizado con el programa estadístico SYSTAT 7.0.

VARIABLES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F	P
Localidad	4.53092E+01	3	1.51031E+01	1.41935E+01	0.000000004
Mes	1.181169E+02	3	3.93897E+01	3.70176E+01	0.000000000
Mes x localidad.	1.27977E+02	9	1.42197E+01	1.33633E+01	0.000000000
Error	2.70170E+03	2539	1.064081063		

El análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas entre las poblaciones de La Tinaja, El Ranchito, La Louisiana y Las Trojas (Figura 11).

Las poblaciones reflejaron diferencias en el número de brotes formados. Según el análisis de Tukey la población de El Ranchito tiene diferencias altamente significativas con la Louisiana, La Tinaja y Las Trojas y la población de La Louisiana tiene diferencias significativas sólo con La Tinaja.

Las poblaciones presentaron una respuesta diferente al mismo tratamiento, reflejándose esto en el número de brotes producidos por embrión (Tabla 7). No se observaron diferencias

significativas en los tiempos de respuesta inicial cumpliendo los tiempos descritos en el apartado 4.1.

Figura 11. Respuesta morfogénica *in vitro* de 4 poblaciones de *Picea chihuahuana* después de 5 meses en cultivo. Semillas colectadas en 1997. (Promedio \pm un error estándar).

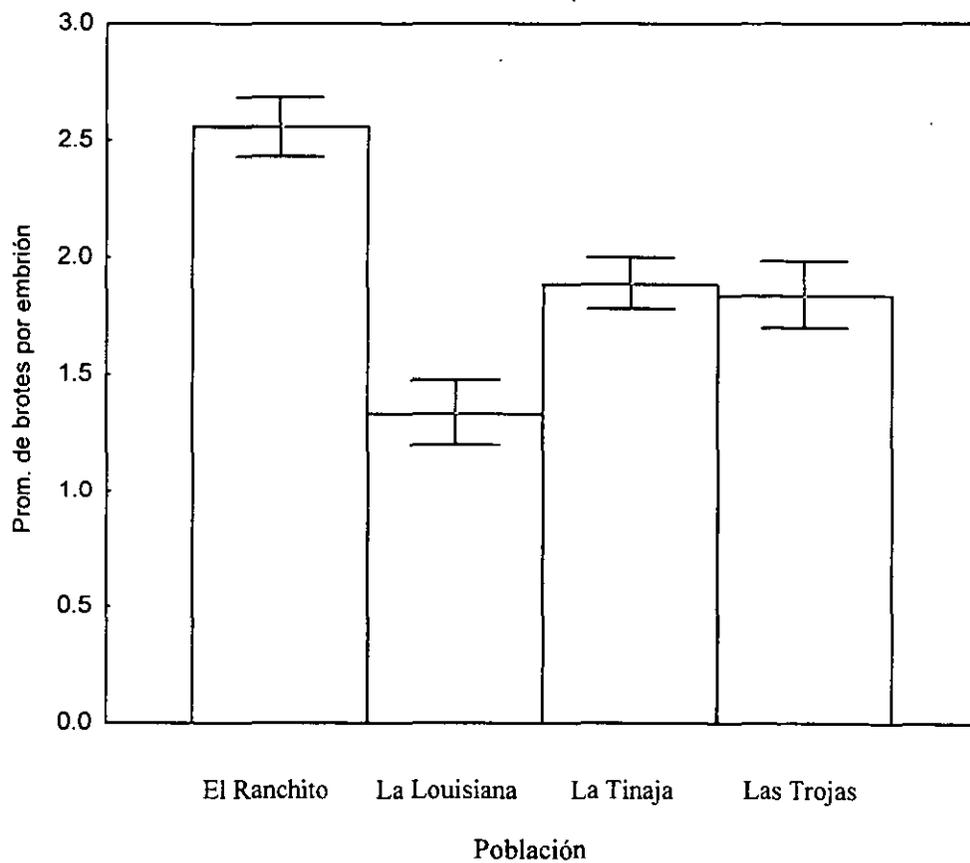
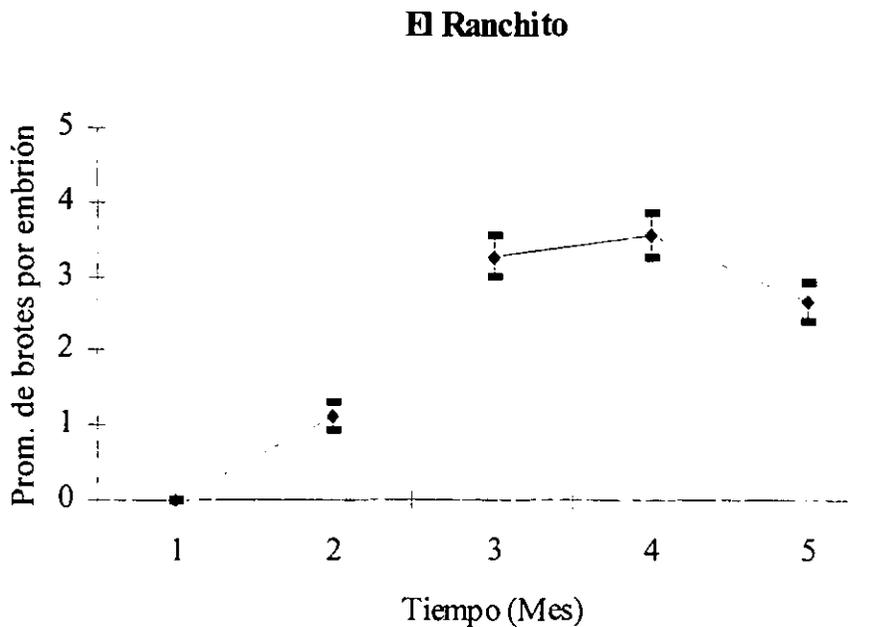


Tabla 7. Promedio de brotes por embrión de las cuatro poblaciones de *Picea chihuahuana* cultivados en medio SH durante 5 meses a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 16 h luz.

LOCALIDAD	MES				
	1	2	3	4	5
El Ranchito	0	1.13	3.24	3.53	2.65
La Tinaja	0	1.45	2.78	4.17	0.14
Las Trojas	0	1.69	2.48	2.01	1.26
La Louisiana	0	1.50	1.71	1.46	0.75

Como resultado, se obtuvo que los embriones más regenerativos fueron de la población El Ranchito, en los cuales se presentó un mayor número de brotes y mejor sobrevivencia a lo largo del tiempo, los brotes de esta localidad llegaron a una talla de (5-7 mm).

Figura 12. Comportamiento del desarrollo morfogénico *in vitro* de la población El Ranchito durante 5 meses de cultivo. Semillas colectadas en 1997. (Promedio \pm un error estandar).

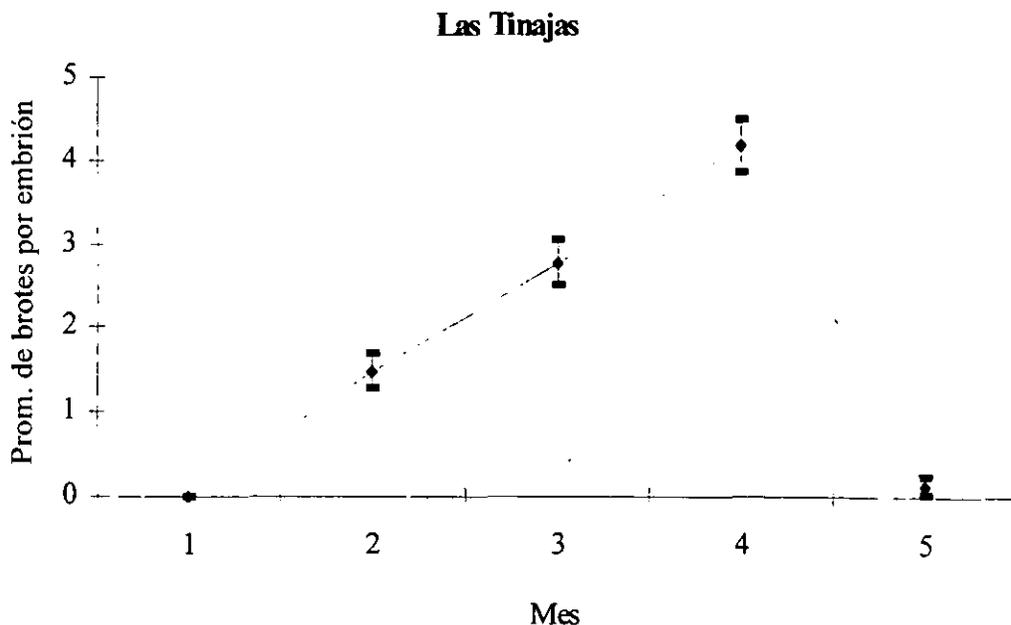


Como se muestra en la figura 12 el comportamiento morfogénico de la población El

Ranchito incrementó notablemente del segundo al tercer mes de cultivo mostrando su máxima formación de brotes al cuarto mes, a partir del cual, desciende la formación de brotes en esta población. En este mes también ocurre un alto porcentaje de oxidación (Tabla 3 y Figura 9).

Los embriones de La Tinaja mostraron inicialmente un buen desarrollo y el número de brotes que no fue superado notoriamente por la población de El Ranchito, sin embargo, sólo en el cuarto mes de cultivo La Tinaja superó el número de brotes producidos por El Ranchito (Tabla 7) y posteriormente ya no se observaron nuevos brotes consolidados, en el quinto mes de cultivo en esta población se observó un descenso crítico en la formación de brotes, que llegó incluso, a la formación nula de brotes, La Tinaja al quinto mes de cultivo tuvo la producción más baja de brotes que el resto de las poblaciones (Figura 13).

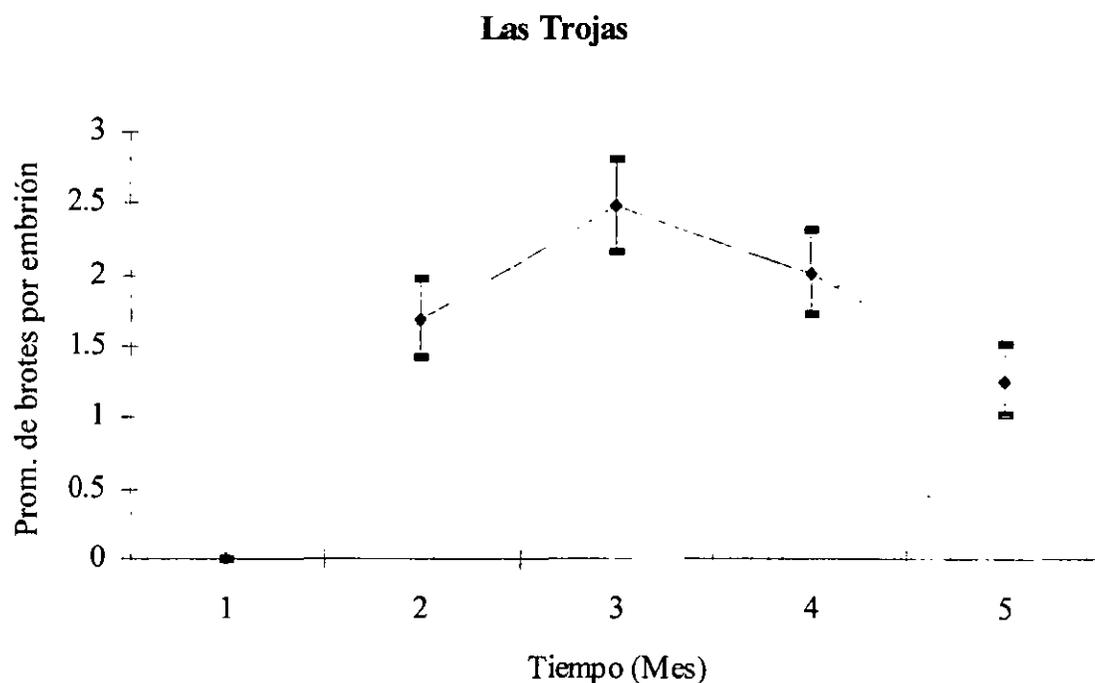
Figura 13. Comportamiento morfogenético de *Picea chihuahuana* en la población La Tinaja a lo largo de 5 meses en cultivo. (Promedio \pm un error estándar).



Los embriones de la población de Las Trojas tuvieron una formación de brotes inferior a La Tinaja pero sin diferencias significativas entre ellas, su máxima producción de brotes fue

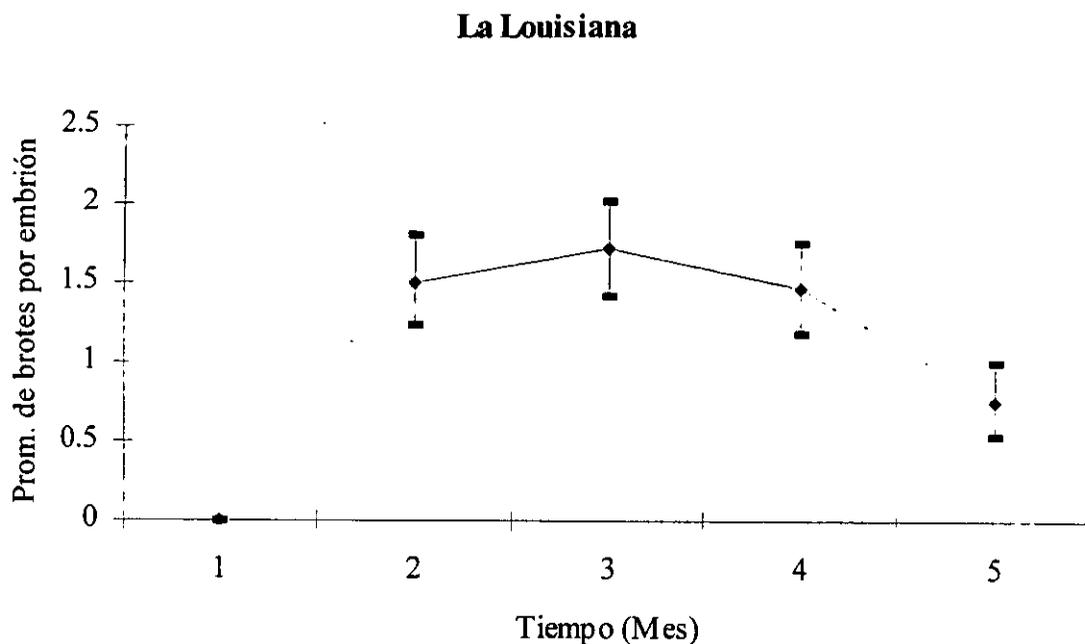
entre el segundo y tercer mes de cultivo (Figura 14) disminuyendo en el cuarto y quinto mes de cultivo en este último mes la oxidación incrementó de forma notoria (Figura 9).

Figura 14. Comportamiento morfogénico de *Picea chihuahuana* en la población Las Trojas durante 5 meses en cultivo. (Promedio \pm un error estándar).



La población de La Louisiana mostró una respuesta muy inferior al resto de las poblaciones, el porcentaje de respuesta fue el más bajo de todos, además de presentar mayores casos de oxidación desde los primeros meses de cultivo, su pico máximo de formación de brotes fue al tercer mes y posteriormente disminuyó. Presentó al quinto mes de cultivo un promedio de brotes por embrión inferior a uno (Figura 15).

Figura 15. Comportamiento morfogénético de *Picea chihuahuana* en la población de La Louisiana



4.5 Enraizamiento de brotes adventicios.

Los brotes adventicios de *Picea chihuahuana* generados no desarrollaron raíces de manera espontánea, por lo que fue necesario someter los brotes a diferentes tratamientos para la inducción de raíz.

De los diferentes tratamientos realizados para inducir enraizamiento solamente en 4 se logró la inducción de raíces (Tabla 8).

No se logró inducir el enraizamiento en medio SH con AIB y AIA en concentraciones de 5 y 10 mg con pulsos de 24 y 48 h, en ninguna de las 8 combinaciones hormonales se observó el desarrollo de raíces, tampoco se observó ningún cambio morfológico o físico en los brotes tratados durante los 2 meses siguientes al pulso de auxinas.

Tabla 8. Resultados de los tratamientos para inducir enraizamiento de brotes adventicios formados a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ fotoperiodo 16h luz).

No. De brotes	Tratamiento	No. De brotes con raíz	Porcentaje de enraizamiento
3	Pulso de 24 h con ANA 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con ANA 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 24 h con ANA 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con ANA 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 24 h con AIB 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con AIB 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 24 h con AIB 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con AIB 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 24 h con AIA 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con AIA 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 24 h con AIA 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
3	Pulso de 48 h con AIA 10 mg/l + sacarosa 15 g/l	0	0
15	Pulso de 24 h con ANA 4 mg/l + sacarosa 15 g/l	1	6.6
15	Pulso de 24 h con ANA 5 mg/l + sacarosa 15 g/l	1	6.6
15	Pulso de 24 h con ANA 6 mg/l + sacarosa 15 g/l	2	13.33
19	Medio de inducción RIM + ANA 1 mg/l + sacarosa 30 g/l	7	36.84
15	SH50% + sacarosa 20 g/l + Ác. Abscísico 0.1 mg/l, AIB 1 mg/l, BA 0.5 mg/l	0	0
15	Turba: perlita: vermiculita humedecida con SH $\frac{1}{4}$ + sacarosa 10 g/l + ANA 0.93105 mg/l	0	0
15	Pulso de 72 h con AIB 10 mg/l en medio MS líquido	0	0

En los brotes tratados en medio SH con ANA 4, 5 y 6 mg con pulsos de 24 h se observó después de 40 días el desarrollo de raíces, los brotes continuaron físicamente sanos, se observó un engrosamiento en la base del tallo y una separación de acículas en cúmulos aparentando varios brotes unidos en la base, la cual desarrolló varias raíces, en algunos casos estas raíces se manifestaron sólo como pequeñas protuberancias sin elongarse posteriormente.

Con el pulso de ANA 4 mg/l las acículas de los brotes permanecieron verdes, sin aumentar de tamaño, sólo un brote desarrolló raíz. La base del brote se engrosó consolidándose posteriormente una raíz. Aunque previo al tratamiento se removió el tejido superficial y se realizó un corte transversal, después del tratamiento se observó la formación de acículas en la base, aparentemente, formando otro brote. La raíz obtenida mostró un color amarillento en la base aclarándose hacia el ápice (Figura 16 A). Después de un mes de la formación de la raíz no se observó una elongación notable, después de 2 subcultivos (60 días) los ápices de las hojas empezaron a marchitarse y la raíz empezó a tornarse obscura sin crecimiento aparente.

Cuando los brotes se sometieron a un pulso de ANA 5 mg/l las acículas de los brotes se observaron en algunos casos con los ápices ligeramente marchitados, las acículas un poco separadas en cúmulos y la base engrosada con un color amarillento de la que sobresalen pequeñas protuberancias de color claro, sólo una de éstas se observó de mayor tamaño y de color claro (Figura 16 B-C), no se observó un crecimiento de estas protuberancias, las cuales al igual que el caso anterior se obscurecieron al cabo de aproximadamente 60 días de su desarrollo y las acículas se marchitaron sin crecimiento aparente.

El pulso de ANA 6 mg/l al igual que en los casos anteriores promovió el desarrollo de raíces en un brote y pequeñas protuberancias en otro brote. Las numerosas acículas se separaron en cúmulos, su color se mantuvo verde durante el tratamiento y la expresión de la raíz, la base se engrosó y de ésta se hicieron visibles 2 raíces y 2 protuberancias claras. Al igual que en los casos anteriores no se observó la elongación de ninguna de estas raíces, su color en la base fue amarillento aclarándose hacia el ápice (Figura 16 D-E). En el otro caso sólo se observó la formación de pequeñas protuberancias de color claro sin su posterior elongación. Ninguna de las raíces desarrolladas y descritas anteriormente sobrepasaron los 10 mm de longitud.

Por otro lado, la técnica propuesta por Dumas y Monteuris (1995) para *Pinus pinaster* con medio RIM adicionado con ANA 1 mg/l fue exitoso también para brotes de *Picea chihuahuana*, la cual permitió obtener 7 brotes con raíz (36.84%) al cabo de 12 días del subcultivo en el medio de expresión (REM).

Durante el tratamiento en el medio de inducción no se observaron cambios notables en los brotes, sin embargo, al ser subcultivados al medio de expresión de raíz (REM) se observó que las puntas de las acículas se empezaron a marchitar, además, las acículas se separaron entre sí abriéndose hacia los lados mientras que el centro se ensanchó hacia fuera y no presentó acículas, perdiendo un poco su arreglo inicial. En la base del brote se observó el desarrollo de tejido calloso en todos los casos, cada brote desarrolló más de una raíz. El crecimiento de las diferentes raíces fue de la base del brote a partir del centro del tejido calloso, en algunos casos aparentando raíces laterales y no una raíz central como es caracterizado en coníferas (Figura 17 A-D) En otros casos el brote perdió su arreglo original y del centro meristemático del brote emergió una raíz con crecimiento inicialmente lateral que posteriormente se internó en el medio de cultivo, su aspecto era robusto y la base oscura aclarándose hacia el ápice (Figura 17 E-F). Sin embargo, la sobrevivencia de estos brotes fue corta ya que a los dos meses de la expresión de las raíces las acículas se empezaron a marchitar y la raíz no creció aún cuando se subcultivo a medio líquido para evitar que el agar impidiera su elongación.

La mezcla hormonal propuesta por Montes (1993) para *Picea chihuahuana* no mostró en este ensayo efecto alguno para la formación de raíz, los brotes continuaron verdes y se observó elongación en todos ellos después de 2 meses pero nunca desarrollaron raíz, aún después de 4 meses de cultivo.

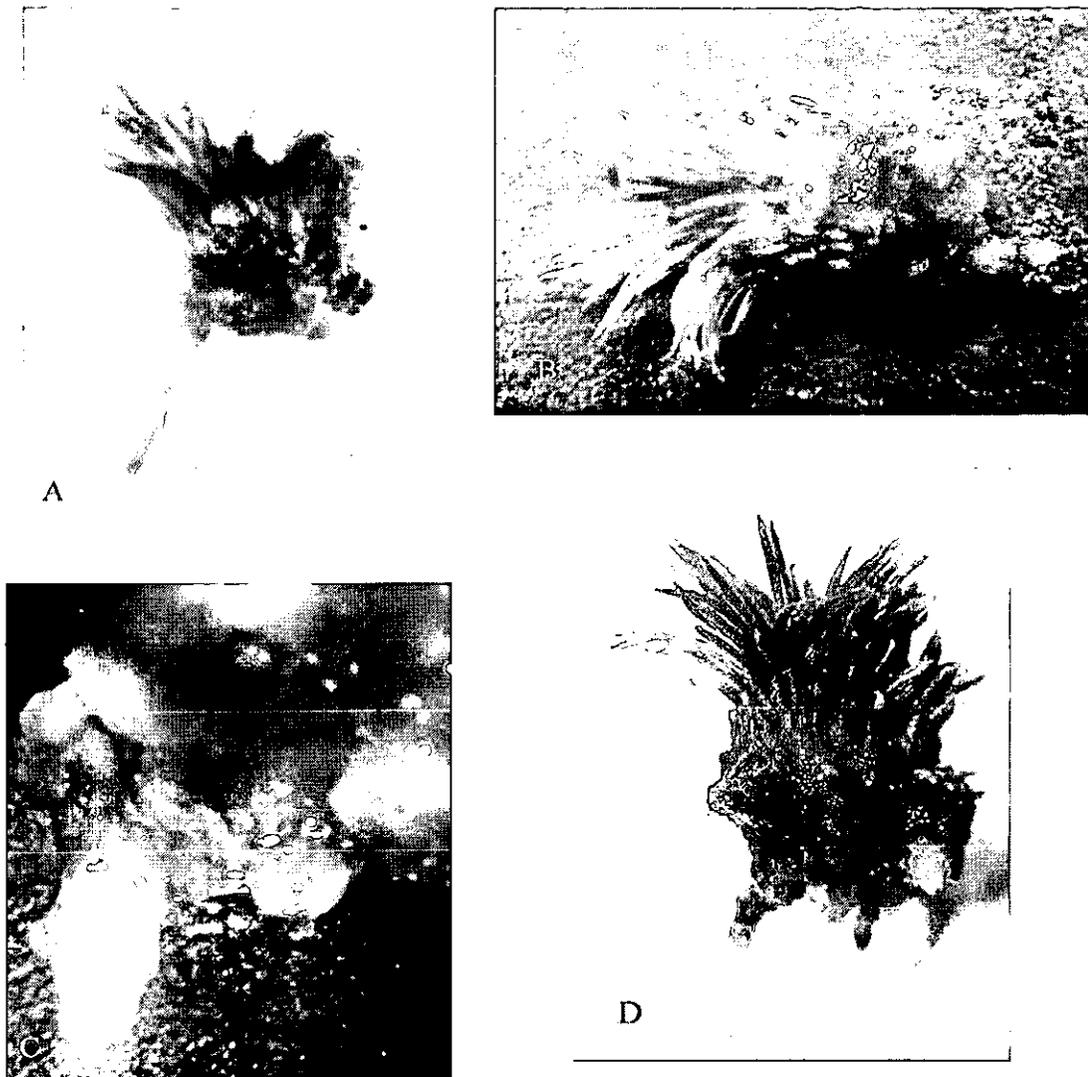


Figura 16. Enraizamiento de brotes adventicios con pulsos de ANA durante 24 h con diferentes concentraciones. A: tratamiento con 4 mg/l de ANA. B y C: tratamiento con 5 mg/l de ANA. D y E: tratamiento con 6 mg/l de ANA.

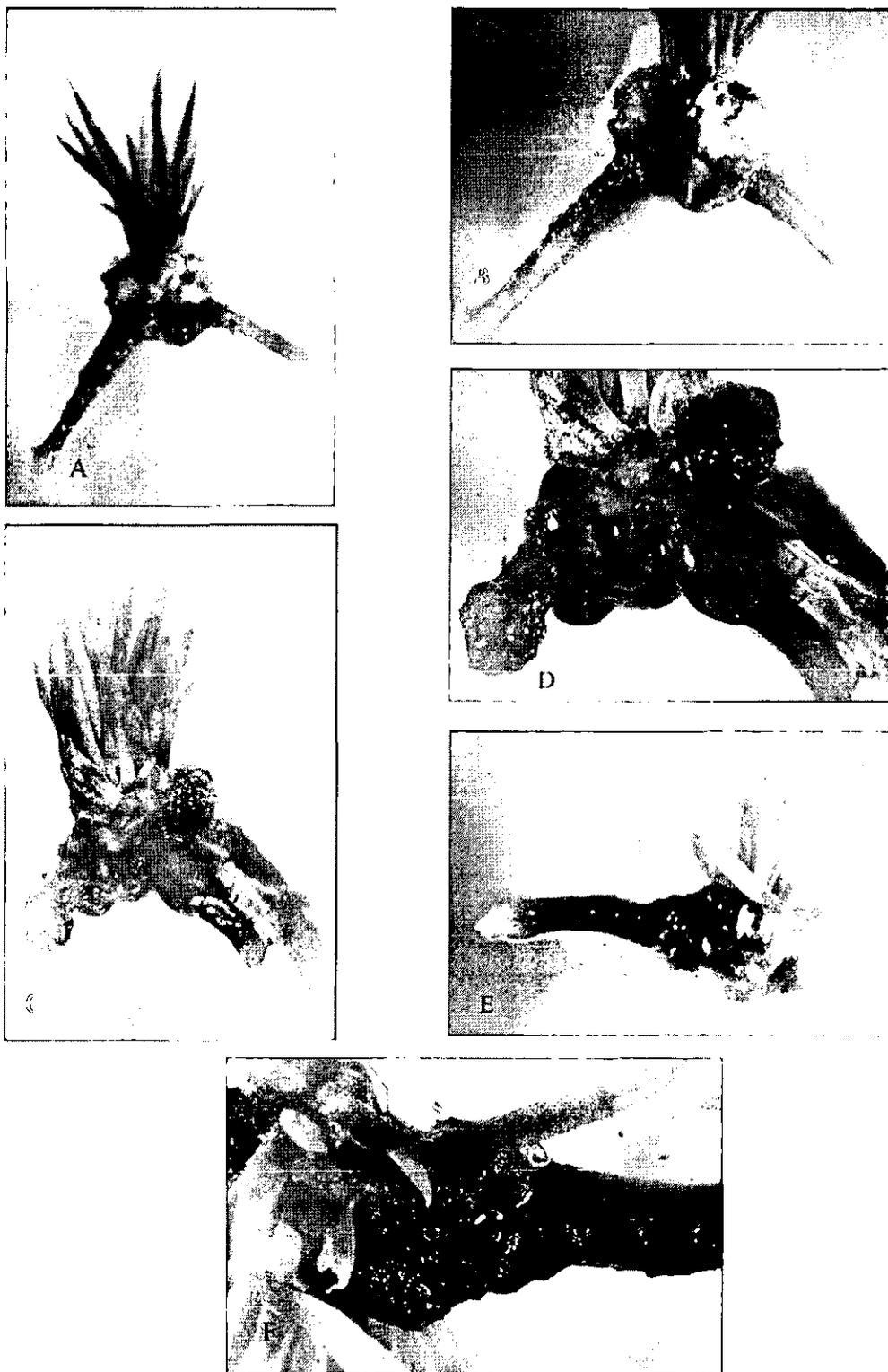


Figura 17. Enraizamiento de brotes adventicios siguiendo la metodología propuesta por Dumas *et al.* (1995). A y B: brote con 2 raíces. C y D: brote con tres raíces laterales. E y F: brote con una raíz central.

La técnica propuesta por Harry *et al.* (1995) para *Juniperus cedrus* no presentó ningún brote con desarrollo de raíz, además de presentar los ápices de las acículas marchitos en la segunda semana de tratamiento y un color verde pálido en todos los explantes. El índice de contaminación fue de 33.33%. Los brotes no contaminados se marchitaron rápidamente sin la expresión de raíz ni el mejoramiento de su aspecto durante los siguientes dos meses.

La técnica propuesta por Sánchez para el enraizamiento de coníferas, tampoco presentó efecto alguno en la formación de raíz, aún después de 4 meses, los brotes no mostraron cambios morfológicos ni ningún tipo de desarrollo después del tratamiento, sólo se mantuvieron verdes y de buen aspecto.

5 DISCUSIÓN

Es bien conocido que la capacidad morfogenética de los explantes, en este caso embriones, se encuentra fuertemente ligada a factores intrínsecos de los mismos, como la edad y el estado fisiológico de la planta madre. El ambiente es selectivo y determina los genotipos que sobreviven a la expresión fenotípica de los individuos. La adaptación a ambientes específicos está dada por las fuerzas de selección, lo que crea poblaciones que difieren de un sitio a otro. La diferencia entre sitios o procedencias va desde características de crecimiento, longitud de acículas, calidad de la madera, conos, semillas, etc. Dentro de las características importantes en coníferas, se encuentra el peso y tamaño de las semillas, las cuales varían de un sitio a otro y por lo tanto son susceptibles de reflejar características distintas entre sí y éstas pueden tener algún valor tanto adaptativo como comercial (Alba *et al.* 1996).

En este trabajo se pudieron observar diferencias en el tamaño de las semillas en las diferentes poblaciones estudiadas. Con respecto a estas diferencias entre las semillas de cada población Ortega (1997) reportó diferencias significativas entre las semillas de 6 poblaciones de *Picea chihuahuana* en cuanto a variables como longitud, ancho, grosor y peso. En el presente estudio la diferencia en los tamaños fue evidente pero no se analizó el peso de las semillas. Tres poblaciones (La Louisiana, La Tinaja y El Ranchito) no presentaron entre sí diferencias notables en el tamaño de su semilla, sin embargo, la población de Las Trojas tenía en su mayoría semillas de tamaños inferiores al resto de las poblaciones.

Con estas diferencias en tamaños puede inferirse que el hábitat y las condiciones ambientales de estas poblaciones no son iguales. Estas variaciones por mínúsculas que sean, afectan el estado físico y fisiológico de la planta madre que pueden afectar incluso su genotipo, el cual se sabe es variable de individuo a individuo en la naturaleza. Las mismas variaciones pueden intervenir en el ciclo de vida de cada población. Se conoce el ciclo general de la especie pero no se han hecho estudios comparativos en el tiempo del ciclo de cada población, el cual puede variar en días o meses. Un ejemplo de estas variaciones ambientales de población a población es el grado de humedad de cada sitio. Gordon (1968) encontró diferencias en el crecimiento y asociaciones de *Picea chihuahuana*, cuando se encuentra en

sitios con alta humedad. En estos sitios se da mayor competencia con herbáceas, lo cual afecta el desarrollo de los árboles de esta especie y el establecimiento de plántulas en estos sitios principalmente durante los primeros 10 años, el tiempo que tardan los árboles de estos sitios hasta su tamaño adulto toma 26 años. En sitios con un grado de humedad más bajo y un clima fresco los árboles de esta especie crecen con mayor rapidez y el establecimiento de las plántulas y su desarrollo hasta su talla adulta toma sólo 16 años.

Sin embargo, no existen datos exactos en el tiempo de desarrollo de la semilla desde la polinización, pero no puede descartarse la posibilidad de que estas variaciones de sitios fisiográficos influyan en la polinización y desarrollo de la semilla, sin estos datos puede estar cometiendo el error al coleccionar las semillas cuando se encuentran en etapas tempranas de su desarrollo, ya que para la colecta de la semilla se toman los conos cerrados del árbol y se induce su apertura mediante aire caliente, por lo que la diferencia en tamaño y el hecho de que resulten vanas en algunas poblaciones, puede deberse a diferencias en los tiempos de desarrollo de cada población, lo cual significa que las semillas se hayan coleccionado antes de su total desarrollo o incluso sean los remanentes de la producción de semilla de ese año. Este error pudo llevarse a cabo la colecta de semillas de la población de Las Trojas ya que el tamaño de estas semillas era muy pequeño (1-3 mm) y el número de semillas vanas fue muy alto.

5.1 Inducción de brotes adventicios

La inducción de brotes adventicios se llevó a cabo en el medio SH adicionado con kinetina 5 mg/l. Mata (2000), reportó que en esta especie la proliferación de brotes ocurrió en una amplia gama de combinaciones hormonales, pero más comúnmente cuando la concentración de citocininas fue alta con relación a una baja o nula concentración de auxinas. Thorpe *et al.* (1991) indicó que para el desarrollo de brotes adventicios la aplicación exógena de citocinina es necesaria, así mismo embriones de *Pinus pinea* L. desarrollaron brotes adventicios en medio GD y SH con una concentración alta de citocininas, sin embargo, se observó una mejor respuesta con kinetina (sola o en combinación con auxinas, en donde la concentración de kinetina fue mayor), esto se ha presentado también en especies como *Abies alba* Mull. (Schuller *et al.*, 1989); *Abies nordmanniana* (Norgaard y Krogstrup, 1991),

Ceratozamia euryphyllidia (Chávez *et al.*, 1998) y *Picea omorika* Planc. (Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric, 1995), además de que la baja concentración de sales, principalmente nitrogenadas contenidas en el medio SH, favoreció esta respuesta (Mata, 2000).

El medio SH ha favorecido el crecimiento *in vitro* de especies de coníferas como *Pseudotsuga macrolepis* Flous. (García-Campusano, 1999), *Pinus strobus* L. (Goldfarb *et al.*, 1996), *Pinus sylvestris* L. (Sul y Schuyler, 1998) y *Pinus ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989).

Las diferencias en el porcentaje de respuesta al medio de inducción entre las poblaciones reflejan diferencias fisiológicas en las semillas de cada población, esto puede ser indicativo de las condiciones hormonales endógenas del tejido que junto con los reguladores exógenos estimulan la proliferación del tejido para formar brotes adventicios. La población que presentó el mayor porcentaje de respuesta al medio de inducción fue La Tinaja (88.82%), seguida por El Ranchito (78.12%), estas poblaciones también presentaron el mayor número de brotes adventicios que se discutirá posteriormente (Tabla 2). En la población de Las Trojas se observó que a pesar del tamaño inferior de la semilla, los embriones de éstas respondieron en un porcentaje alto (70.2%), la población con menor porcentaje de respuesta fue La Louisiana (33%) en estas semillas se observaron embriones pequeños aún cuando las semillas en tamaño no tenían diferencias respecto a las poblaciones de El Ranchito y La Tinaja. En la población de La Louisiana el tamaño de la semilla no refleja las condiciones del embrión, el cual pudo no presentar las concentraciones hormonales endógenas ideales para promover junto con los reguladores exógenos respuesta alguna al medio de inducción, estos embriones permanecieron sin cambio alguno desde su extracción de la semilla.

El desarrollo de los embriones maduros en el medio SH, fue muy similar al reportado por Mata (2000) para embriones inmaduros de esta especie, en los que se observó el hinchamiento de los cotiledones con superficie nodular a los 30 días de cultivo, y el desarrollo de los brotes se dio principalmente en los cotiledones y no se observó desarrollo de brotes en el hipocótilo, el cual se tornó de un color oscuro igual que los resultados observados en este estudio. Thorpe y Biondi (1984) reportaron que la formación de brotes adventicios ocurre en la periferia del explante a partir del desarrollo de células meristemáticas, la proliferación de estas células resulta en el hinchamiento del explante y la formación de tejido llamado "centros meristemáticos de brotes", la formación de brotes en embriones maduros de *Picea*

chihuahuana tienen un comportamiento similar al ser inducida la formación de brotes en medio SH con kinetina 5 mg/l, en la que los cotiledones se hincharon y la superficie del explante se torno rugosa con apariencia nodular (Figura 7 A-D).

Un comportamiento similar en la formación de brotes adventicios se observó en el cultivo de embriones de *Pseudotsuga macrolepis* (García-Campusano, 1999) en medio SH con sacarosa 30 g/l y diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento ANA, 2,4-D, BA y K (0.1-5 mg/l), en la que observó la formación de las primeras protuberancias nodulares y primordios foliares, en los ápices, costados y base de los cotiledones entre los 15-30 días, consolidándose en el medio de elongación entre los 30-40 días tomando una forma de roseta bien definida. En cultivos de embriones de *Pinus ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989) en medio SH con BA 5 mg/l, se observó la proliferación de brotes entre los 7-28 días incrementándose entre los 14-28 días sin elongación del epicótilo ni desarrollo de raíz. Una respuesta similar a las anteriores se observó en *Pinus contorta* (von Arnold y Eriksson, 1981; Patel y Thorpe, 1984) y *Pinus sylvestris* (Tranvan, 1979).

Sin embargo, en el presente estudio también se observaron embriones que sólo presentaron hinchamiento sin apariencia nodular. Ellis y Bilderback (1989) observaron este comportamiento en embriones de *Pinus ponderosa* cuando fueron colocados de forma horizontal sobre el medio de cultivo, los cotiledones inferiores, en contacto con el medio, formaron meristemoides y brotes *de novo*, pero aquellos que no estuvieron en contacto con el medio no formaron brotes. También mencionan que la pérdida en la capacidad de formar brotes durante la maduración, puede deberse a su estado epigenético o fisiológico, los bajos niveles hormonales internos del explante probablemente retardan la capacidad en la formación de brotes.

En *Picea chihuahuana* se observó esta respuesta en algunos casos (Figura 7), sin embargo, en la mayor parte de los embriones excisados, hubo respuesta tanto en los cotiledones en contacto con el medio como en los superiores, un hecho notable de mencionar es que no se observó la germinación en ninguno de los embriones cultivados, estas formas de respuesta reflejan que hay embriones con poca capacidad de respuesta y con diferentes estados fisiológicos al resto de las semillas, sin embargo la mayoría de estos embriones se encuentran en condiciones idóneas para responder al estímulo dado (la formación de brotes) en todos los

cotiledones sin que afecte la posición del explante con relación al medio de cultivo.

5.2 Elongación de brotes adventicios

Como en otras coníferas, la consolidación de los brotes adventicios fue estimulada por la dilución del medio de cultivo a la mitad de la concentración de sus componentes y la reducción de la concentración de sacarosa (Bonga, 1982). Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric, (1995) estimularon la elongación de *Picea omorika* con diluciones del 33.33% de medio MS; Sul *et al.* (1998) llevaron a cabo la elongación de brotes de *Pinus sylvestris* en medio GD al 50% de sus componentes más 2% de sacarosa; de igual manera se llevó a cabo la elongación de brotes adventicios de *Pinus heldreichii* (Stojicic *et al.*, 1999). García-Campusano (1999) diluyó el medio SH al 50% para estimular la elongación de los brotes adventicios conservando la sacarosa al 3% inicial.

Mata (2000) reportó que la disminución en las concentraciones de sacarosa favoreció y aceleró la elongación en esta especie, con 15 y posteriormente 10 g/l de sacarosa logró a partir de embriones inmaduros el desarrollo de brotes con alturas de 10 a 12 mm en sólo dos meses de cultivo. Sin embargo en el presente estudio esta disminución de sacarosa a los embriones maduros en cultivo favoreció la consolidación pero no la elongación de los brotes. Se ha reportado que en algunas especies de coníferas la disminución de sacarosa por debajo del 2% decrece la elongación y sobrevivencia de los brotes formados, esto se ha dado en especies como *Picea abies* (von Arnold y Eriksson, 1978) y *Pinus pinaster* (Calixto y Pais, 1997).

Otra posible respuesta a esta diferencia de resultados puede deberse al estado fisiológico del explante, ya que Mata trabajó con semillas inmaduras de la población de La Louisiana, colectada en el año de 1995, aunque en este estudio se incluye a esta población, no se observó una respuesta similar ya que también se observaron brotes de menor talla a la reportada por Mata. Estos resultados reafirman la variación de respuestas dependiendo del tipo de explante utilizado, en este caso el estado fisiológico de la semilla (madura) afecta directamente en la respuesta al cultivo *in vitro* aunado a esto, está la variación genética que representa el trabajar con semillas, incluso entre individuos dentro de una misma población.

5.2.1 Oxidación

El principal problema para concretar la morfogénesis a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* fue la oxidación que se presentó en los embriones de todas la poblaciones evaluadas resultando letal para los embriones (Tabla 3).

Phillips y Gamborg (1995) definen a la necrosis o oscurecimiento del tejido como el resultado de la oxidación de compuestos fenólicos secretados por el tejido. Fagerstedet *et al.* (1998) relacionó la actividad de las peroxidasas y polifenoloxidasas con la lignificación de las células ya que fue encontrada en madera suave y madera dura de *Pinus sylvestris*.

El fenómeno de la oxidación es comúnmente observado en el caso de tejido maduro pero también se ha observado el oscurecimiento del tejido proveniente de embriones o plántulas (Laukkanen *et al.* 1999).

Las poblaciones más afectadas por la oxidación fueron La Louisiana y Las Trojas, de las cuales anteriormente se discutieron sus variaciones en tamaños de semilla y respuesta al medio de inducción, ambas poblaciones presentaron los mayores índices de oxidación y a mayor velocidad desde los primeros meses del cultivo (Figura 9), lo cual puede representar que en el embrión las cantidades endógenas de auxina no eran adecuadas para la formación de brotes adventicios, la oxidación resultó letal para ambas poblaciones al quinto mes de cultivo.

La Tinaja fue la población menos afectada por la oxidación de sus embriones, presentando un bajo porcentaje de oxidación aún después de 5 meses de cultivo. La semilla de la población El Ranchito tanto del año 1995 como 1997 presentaron un índice similar de oxidación de sus embriones, sin embargo ésta no resultó letal permitiendo que se diera una mayor elongación en los brotes consolidados, incluso la semilla con mayor edad y tiempo de almacenamiento (desde 1995) presentó mayor elongación en sus brotes adventicios (15-18 mm).

En un estudio de la oxidación en *Pinus sylvestris* se observó que la actividad de las peroxidasas y polifenol oxidasas a partir de explantes tomados de árboles maduros, está muy relacionada con la edad del donador ya que a mayor edad de la planta madre, esta actividad se incrementa. El oscurecimiento observado en el tejido de *Pinus sylvestris* se mostró muy relacionado con el tiempo de cultivo pero en cultivos derivados de embriones inmaduros, este oscurecimiento fue más relacionado a la transferencia del tejido, del medio de proliferación al

medio de maduración (Laukkanen *et al.*, 1999). En *Picea chihuahuana* la oxidación parece estar relacionada con la transferencia del medio de inducción al medio de elongación ya que durante los 30 días de inducción no hubo signos evidentes de oxidación y al ser transferidos al medio de elongación se hizo presente la necrosis en algunos de los embriones, aumentando considerablemente en los meses siguientes. Una respuesta similar a la obtenida se ha presentado en embriones de *Pseudotsuga menziesii* (Bonga y von Aderkas, 1992) y *Pseudotsuga macrolepis* (García-Campusano, 1999) en donde la oxidación también se presentó en los embriones después del primer subcultivo, en el caso de *Pseudotsuga menziesii* se relacionó a la oxidación con los altos niveles de sacarosa contenidos en el medio (60 mg/l), en el caso de *Picea chihuahuana* un alto nivel de sacarosa podría no ser el factor promotor de la oxidación dado que la sacarosa se disminuyó a 15 g/l en el medio de elongación.

En el presente estudio se encontró una relación inversa entre la oxidación de los cultivos y la formación y desarrollo de los brotes adventicios. Varios factores enzimáticos como las peroxidasas y polifenol oxidasas pueden producir efectos indirectos en la capacidad de regeneración, se ha sugerido que la alta actividad de éstas reduce el crecimiento y detiene el desarrollo embriogénico, ya que la oxidación de compuestos fenólicos pueden inhibir la actividad enzimática resultando en el oscurecimiento del tejido en cultivo y posteriormente la muerte de los explantes (Laukkanen *et al.*, 1999).

Aunque Mata (2000) reporta que la oxidación puede ser evitada cuando los embriones son sumergidos en una solución de ácidos ascórbico y ácido cítrico (250 mg/l de cada uno) durante 30 minutos en cada subcultivo, George (1993) reporta que la adición de antioxidantes al tejido o al medio de cultivo puede inhibir el enraizamiento por lo que se decidió llevar a cabo el experimento, sin la aplicación de baños con antioxidantes y buscar la disminución de la oxidación por la rotación de embriones y subcultivos periódicos. Laukkanen *et al.* (1999) mencionan que la actividad de las peroxidasas incrementan rápidamente al principio del cultivo y posteriormente decrece con la edad del cultivo por lo que la rotación y subcultivos constantes podrían ser efectivos para evitar oxidación de los brotes de mayor talla y edad, pero en las etapas tempranas de cultivo es necesario tratar al explante con baños antioxidantes como fue propuesto por Mata (2000).

5.2.2 Comparación de la respuesta morfogénica de semillas de una misma población colectadas en diferentes años.

Se observó que las semillas de una misma población colectadas en diferentes años tuvieron diferencias significativas en el número de brotes formados por embrión (Tabla 4). Las semillas colectadas el año 1993 no respondieron de forma favorable a la inducción de brotes adventicios por lo que no se pudo comparar con las semillas colectadas en otros años. Las semillas que formaron un mayor número de brotes por embrión después de 5 meses de cultivo fueron las colectadas el año 1995, superando notablemente el número de brotes formado por los embriones del año 1997.

Se ha mencionado que la viabilidad de las semillas se vuelve más variable a lo largo del tiempo de almacenamiento y usualmente disminuye (Grijomo *et al*, 1984). En las especies del género *Picea* se han observado características de longevidad y almacenamiento similares. Se ha reportado que las semillas de este género pueden ser almacenadas por periodos de 5 a 17 años sin que pierdan viabilidad, sin embargo la longevidad de las semillas está determinada genéticamente y varía según la especie.

Las semillas colectadas en el año 1995, tenían aproximadamente 3 años y 4 meses de almacenamiento desde su colecta, las semillas colectadas el año 1997 tenían 1 año 5 meses y las semillas colectadas en el año 1993 tenían 5 años 3 meses de almacenamiento cuando se llevó a cabo el experimento. En un estudio hecho con *Pseudotsuga macrolepis* (García-Campusano, 1999) se observó que la capacidad de respuesta (formación de brotes adventicios) disminuyó en semillas con mayor tiempo de almacenamiento.

Se desconoce el tiempo de viabilidad y de latencia de las semillas de *Picea chihuahuana*, poco se sabe de su ecología y desarrollo, sin embargo los resultados obtenidos nos hacen pensar, que la respuesta diferencial entre las semillas colectadas en diferentes años se debe a su estado fisiológico, cambiante a lo largo del tiempo y tipo de almacenamiento, se sabe en general que las semillas requieren de un periodo de maduración posterior a su dispersión para lograr su germinación, si la semilla no ha superado esta etapa, la germinación no se da, aún cuando las condiciones ambientales lo favorecen, por lo que podemos decir que en este estudio observamos diferentes estadios fisiológicos del embrión, que son mantenidos y reflejados en el cultivo *in vitro*, aún cuando se proporcionaron condiciones para lograr su respuesta.

Otro factor importante en la variación de estas semillas puede deberse a las condiciones climatológicas del año en que fueron formadas que influyen directamente en la calidad de la semilla, desafortunadamente no existen datos exactos sobre las condiciones climáticas en cada localidad que pudieran aclarar la intervención de estos factores. Sin embargo comparando el trabajo de Mata (2000), en el que se trabajó con el mismo lote de semillas de la población de El Ranchito del año 1995 utilizadas también en este estudio, obtuvo promedios similares en la formación de brotes por embrión (3.9) con tallas de 5 a 25 mm. En el presente estudio el número de brotes por embrión para el mismo lote de semillas fue de 6.48 después de 6 meses de cultivo y las tallas alcanzadas por los brotes fue de 5-15 mm. Este lote de semillas (colectadas en 1995) fue el de mejor respuesta y desarrollo morfogénico, incluso al compararse con semillas de otras poblaciones de años más recientes en este estudio. Lo anterior podría reflejar que las semillas de esta población formada en el año 1995 tuvo un mejor desarrollo y posiblemente mejor genotipo comparado con las semillas colectadas en 1997, el cual posiblemente fue reflejado en su desarrollo *in vitro*.

5.2.3 Respuesta morfogénica de diferentes poblaciones

El promedio de brotes generados por embrión, muestra que están dentro de lo reportado para otras coníferas (3-11 brotes/embrión), sin embargo están más cercanos a los valores bajos, *Pinus banksiana* 14 brotes/embrión (Harry y Thorpe, 1994); *Juniperus cedrus* 6-7 brotes/embrión (Harry, *et al.*, 1995); *Pinus silvestris* 10-20 brotes/embrión (Sul y Korban, 1998); *Pinus pinea*, 10-20 brotes/embrión (Sul y Korban, 1998); *Pinus heldreichii* Christ., 16 brotes/embrión (Stojicic *et al.*, 1999) *Picea sitchensis* (Bong.) 1.5-18.3 brotes/embrión (Drake *et al.*, 1997); *Picea omorika* 4.2-9.4 brotes/embrión (Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric, 1995).

La población de El Ranchito fue la de mayor capacidad morfogénica teniendo diferencias significativas con La Louisiana, Las Trojas y La Tinaja. La curva de crecimiento de El Ranchito se presentó más lenta y mas estable que el resto de las poblaciones (Figura12).

La población de menor respuesta y mayores problemas en la consolidación de los brotes adventicios durante todo el tiempo de cultivo fue La Louisiana, el número de brotes

producidos fue muy bajo y la oxidación letal desde el primer subcultivo al medio de elongación. Las poblaciones de Las Trojas y La Louisiana no presentaron diferencias significativas entre ellas, ambas poblaciones presentaron severa oxidación a lo largo del cultivo (Tabla 7) y presentaron valores bajos en la formación de brotes.

Todas las poblaciones presentaron un incremento en la formación de brotes desde el segundo mes de cultivo llegando a su pico máximo entre el tercero y cuarto mes, en el quinto mes se observó una caída drástica en todas las poblaciones, en gran parte debido a la oxidación del tejido.

En el caso de Las Tinajas (Figura 13), el número inicial de brotes es mayor al de El Ranchito, y aumentó considerablemente hasta el cuarto mes en donde se observó la producción máxima de brotes, superando en este mes a El Ranchito. Sin embargo en los brotes de Las Tinajas aunque no se observaron necrosados, los de mayor tamaño perdieron su coloración verde tornándose blancos, presumiblemente por la pérdida de clorofila en el tejido. En muchas especies cultivadas se ha observado la pérdida de su capacidad morfogenética rápidamente en un par de subcultivos. Street (1979) postuló que la capacidad inicial morfogenética, depende sobretodo de los reguladores del crecimiento y metabolitos acarreados a partir del explante inicial, los cuales son rápidamente diluidos o degradados en el cultivo.

Se sabe que la respuesta al cultivo de tejidos está mediada principalmente por el genotipo (Bergmann y Stomp, 1994) y el estado fisiológico del explante (Bonga y Durzan, 1982). Existen diversos estudios que demuestran que diferentes genotipos de la misma especie responden de manera distinta al cultivo *in vitro*. García-Campusano (1999) reportó diferencias en la respuesta morfogenética de *Pseudotsuga macrolepis* cuando la semilla proviene de diferentes árboles y diferentes poblaciones. Esta misma respuesta se ha observado en especies como *Pinus contorta* (von Arnold y Eriksson, 1981), *Pinus populus*, *Pinus radiata* y *Picea abies* (Bergmann y Stomp, 1994) y *Pinus caribaea* (Litz *et al.*, 1998).

Se observó además que las poblaciones de La Louisisana y Las Tinajas presentaron diferencias significativas en el número de brotes formados. Esta particular diferencia puede ser el producto de una adaptación ya que Ortega (1997) reporta que hay una variación en el número de cotiledones en las poblaciones de *Picea chihuahuana*, mostrando una reducción de los mismos en algunas poblaciones, entre ellas encontramos a La Louisiana, que presenta

menor número de cotiledones que Las Tinajas. Si esto es así, esta variación influye directamente en el número de brotes formados por embrión, ya que los nódulos meristemáticos se forman principalmente en los cotiledones, si el número de cotiledones es mayor, el número de brotes formados por embrión será mayor, por lo tanto la diferencia en respuesta entre estas dos poblaciones puede acreditarse en parte a esta variación, ya que Las Tinajas superó en la formación de brotes a la población de La Louisiana.

Por otro lado estas diferencias entre poblaciones pueden deberse a la heterogeneidad en edades de los árboles de cada población. En un estudio hecho por Sánchez-Martínez (1997), se registraron diferentes edades de árboles en 3 poblaciones de esta especie (La Tinaja, Las Trojas y El Cuervo), todas ellas se encuentran dentro del ejido El Ranchito en el que también se incluye a la población El Ranchito. La población de Las Trojas es más grande y contiene un mayor número de árboles jóvenes (1-10 años) en 1000 m², la población La Tinaja es más reducida con menor arbolado y estructurado por árboles jóvenes y maduros (51-90 años). Esta heterogeneidad estructural podría ser un factor importante en las diferentes respuestas entre poblaciones.

Se sabe que las poblaciones pequeñas pueden perder variabilidad genética con mayor rapidez que las de mayor tamaño y si a esto agregamos la fragmentación de poblaciones, los efectos serán aún más drásticos. El estudio hecho por Ledig *et al.* (1997) demostró que los valores de heterocigocidad de *Picea chihuahuana* son más bajos que los reportados para muchas especies de *Picea*, sin embargo se observan dentro del rango esperado para el género. Ledig y colaboradores concluyeron que las poblaciones de *Picea chihuahuana* tienen un rango aceptable de diversidad genética aún en áreas pequeñas, sin embargo las estimaciones hechas en cuanto a la migración son muy bajas, resaltando esto la importancia de la deriva y el entrecruzamiento de sus poblaciones para la evolución de esta especie, dadas estas condiciones es de esperarse que las poblaciones de esta especie muestren diferencias en su desarrollo *in vitro* reflejo de sus condiciones naturales. Se observó en el presente estudio que en condiciones homogéneas de cultivo para todas las poblaciones, se presentaron diferencias dentro de las mismas poblaciones en el número de brotes por embrión, además se observó que aunque la población en general no mostró una buena respuesta, algunos brotes lograban un mejor desarrollo con tiempos más cortos de elongación y físicamente más vigor el cual pudo

estar determinado por el genotipo de la semilla.

5.3 Enraizamiento

El enraizamiento espontáneo *in vitro* en coníferas es muy raro y es difícil comparado con las angiospermas. Se ha reportado que menos de 5% en coníferas regeneradas *in vitro* desarrollaron espontáneamente raíces (Mohammed y Vidaver, 1988). Sólo se ha observado en algunas especies como *Picea omorika* (Kolevska-Pletikapic y Buturovic-Deric, 1995) de la que se obtuvo 12% de enraizamiento espontáneo y en *Pinus pinaster* (Calixto y Pais, 1997) en la que se presentó enraizamiento espontáneo después de 5 a 6 meses de cultivo en el medio de elongación sin reguladores de crecimiento. Sin embargo en la mayoría de las coníferas propagadas *in vitro* se han tenido fuertes problemas para lograr plántulas completas a partir de brotes adventicios ya que el enraizamiento es la fase más crítica del cultivo.

Muchos factores pueden influir en el proceso de enraizamiento, pero se ha sugerido que este proceso es regulado principalmente por el balance hormonal, sin embargo sólo un número limitado de estudios bioquímicos que controlan el proceso de enraizamiento ha sido reportado en especies leñosas (Blazková *et al.*, 1997). El enraizamiento en coníferas se ha logrado con diferentes auxinas, las más utilizada y con mejores resultados es el AIB, sin embargo algunos trabajos reportan enraizamiento con ANA en especies como *Pinus pinaster* (Dumas y Moteuuis, 1995); *Juniperus cedrus* (Harry *et al.*, 1995) y *Pseudotsuga menziesii* (Chalupa, 1977). Blazková y colaboradores (1997) demostraron que el nivel interno de AIA puede ser modificado por la aplicación de auxinas exógenas, esta modificación dependerá de la cantidad y tipo de auxina suministrada.

En el presente estudio se logró la inducción de raíces con pulsos de ANA en diferentes tiempos, el tratamiento con ANA 5 mg/l, ya había mostrado resultados en investigaciones anteriores. Mata (2000) reportó la formación de raíces robustas y sanas en dos casos con pulsos de ANA 3 y 5 mg/l, en el último caso se logró mayor número de brotes con raíz, así como mayor elongación de éstas. En el presente estudio se realizaron ensayos con pulsos de 24 h con 4, 5 y 6 mg de ANA; en los dos primeros respectivamente se formó una raíz en un brote y en el último se formaron raíces en dos brotes, sin embargo estas raíces fueron muy pequeñas y no se observó mayor elongación. La concentración de sacarosa usada en este estudio para la

expresión de la raíz fue mayor a la utilizada por Mata (2000). Se ha reportado que en la etapa de inducción de raíz .en coníferas, es necesario disminuir las concentraciones de sacarosa, sólo ocasionalmente se ha aumentado posteriormente en el medio de expresión. El papel de la sacarosa en la inducción de raíz no ha sido aclarado y los protocolos obtenidos se han logrado después de múltiples ensayos. En el caso de *Picea chihuahuana* las concentraciones de sacarosa pueden tener un papel importante en la inducción y desarrollo de raíces dado que a lo largo, de este trabajo se ha observado que una baja concentración de sacarosa no favorece el cultivo de esta especie, en el caso del enraizamiento es posible que bajos niveles no sean suficientes para la formación de raíces ya que, se ha observado que en cultivos *in vitro* los carbohidratos son utilizados por la planta para la síntesis de la pared celular y diversas rutas biosintéticas y metabólicas como la respiración (Thorpe, 1982).

Se ha observado en el cultivo *in vitro* que en concentraciones constantes de auxina y bajas concentraciones de sacarosa favorecen la formación de xilema en callo mientras que altas concentraciones dan lugar a la formación de floema (Thorpe, 1982) por lo que es posible que durante la etapa de enraizamiento de esta especie se necesiten periodos de bajas y altas concentraciones de sacarosa para lograr la formación de raíces funcionales.

Las raíces expresadas en el ensayo con pulsos de 24 h no mostraron la formación de callo en el tejido. El hecho de que el tratamiento con auxina no promueva la formación de callo es una ventaja para el enraizamiento, ya que de acuerdo con Rancillac *et al.* (1982) la formación de callo durante el enraizamiento puede provocar disturbios en la formación de las conexiones vasculares entre tallo y raíz, creando desórdenes nutricionales y falta o nulo desarrollo en suelo.

Durante el periodo de enraizamiento se observó que los ápices de algunos brotes se necrosaron, Vietiez *et al.* (1989) postulan que durante un periodo de enraizamiento prolongado la necrosis de los ápices es común debido a la ausencia de citocininas en el medio de enraizamiento sin embargo también se sabe que aún los niveles más bajos de citocininas pueden tener un efecto inhibitorio en el enraizamiento.

En el ensayo 3 con medio RIM adicionado con 1 mg/l de ANA presentó un mayor número de brotes con raíz, en esta técnica también se aumentó la concentración de sacarosa en la fase de expresión, las raíces desarrolladas sin embargo fueron cortas y con el desarrollo de

un poco de callo, después de la expresión no se observó crecimiento de estas raíces, además de que la formación de éstas fue un tanto anormal. Se ha reportado que particularmente el enraizamiento con ANA ha promovido en algunas especies la formación de callo, y está relacionado con altas concentraciones y tiempos de exposición prolongados, aunque Dumas y Monteuis (1995) no reportan la formación de callo durante el enraizamiento de *Pinus pinaster*, en el caso de *Picea chihuahuana* se observó la formación de tejido laxo y amarillento alrededor de la base del brote por lo que tal vez para esta especie, se evite la formación de ese tejido con una ligera disminución de la concentración o menor tiempo en el medio RIM. Los brotes enraizados por este método sin embargo se observaron necrosados de su ápice en un periodo corto posterior a la expresión de la raíz, esto pudo atribuirse a la falta de citocinina en el medio, pero también es probable que sea a causa de desórdenes nutricionales provocados por interrupciones en la conexión vascular debido a la formación de tejido calloso. Se ha reportado sin embargo que la formación de raíz en medio solidificado con agar se da de forma más sincrónica porque los brotes están en contacto uniforme con el medio, sin embargo las raíces producidas en medio con agar son usualmente muy chicas y sin pelos radiculares (Thorpe *et al.*, 1991).

Los ensayos 1, 4, 5 y 6 no reportaron resultados positivos para el enraizamiento, debido tal vez a que las técnicas originales proponen diferentes medios de enraizamiento y en este estudio se utilizó SH. La combinación de auxinas reportadas en la técnica descrita por Montes (1993) para el enraizamiento de esta especie (Ensayo 4) no fue efectivo en este estudio, sin embargo los brotes se mantuvieron verdes y presentaron más elongación y vigor durante el tratamiento.

La técnica propuesta por Harry (1995) para *Juniperus cedrus* tampoco logró la inducción de raíz en *Picea chihuahuana*, además el sustrato representó un problema ya que se registró contaminación aún después de ser esterilizado durante 20 minutos. También se observó que los brotes en este tratamiento se marchitaron rápidamente, la necrosis comenzó en las puntas de las acículas hacia la base, los brotes murieron antes de observarse algún cambio que indicara la formación de raíz. Esta respuesta en los brotes pudo estar relacionada con los nutrientes del medio ya que en este caso, la concentración del medio se redujo a $\frac{1}{4}$ y la concentración de sacarosa fue de 10 g/l, estas concentraciones pudieron estar por debajo del

límite mínimo necesario para la sobrevivencia del explante y por lo tanto ser insuficientes para lograr respuesta alguna en la formación de raíz.

Las raíces logradas en los ensayos 2 y 3 (Figura 5) son un avance significativo en el desarrollo de las investigaciones con esta especie, aunque el porcentaje logrado no es estadísticamente significativo, hay que recordar que sólo se había logrado la inducción de 3 brotes con raíces reportado por Mata (2000) y uno reportado por López-Escamilla (2000). Por lo que el presente trabajo aporta información de gran utilidad para lograr en un futuro el éxito en la propagación de esta especie.

Una ruta a continuar en los esfuerzos para tratar de evitar la extinción de esta especie mexicana sería la intensificación de las investigaciones fisiológicas y estructurales en torno a ella. El cultivo de tejidos, ofrecería una ruta viable para la producción masiva de esta especie, una vez establecida la técnica de micropropagación, además estas técnicas permiten que se realicen estudios fisiológicos y bioquímicos para mejorar el protocolo de propagación e incluso pueden ayudar a comprender el estado actual de las poblaciones y evaluar la mejor estrategia para la conservación de la especie.

El estado actual de las investigaciones con cultivo de tejidos vislumbran un panorama optimista para lograr plantas completas a corto plazo. Una vez logrado el enraizamiento el establecimiento en suelo y posterior aclimatización podrían llevarse a cabo con más facilidad.

La continuación de los estudios sobre la regeneración *in vitro* de *Picea chihuahuana* permitiría aumentar el conocimiento en esta especie para lograr su conservación a menor plazo, antes de que ocurra su extinción total.

6. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo SH adicionado con kinetina 5 mg/l favorece la inducción de brotes adventicios a partir de embriones maduros.
- La oxidación del tejido en *Picea chihuahuana*, se encuentra relacionado al cambio del medio de inducción al medio de elongación, por lo que puede ser una etapa crítica para el éxito en el cultivo de esta especie.
- La oxidación no se vio controlada con la adición de antioxidantes al medio de cultivo, tampoco con la rotación y continuo subcultivo de los embriones. Para lograr el control de este fenómeno es necesario la adición de antioxidantes directamente al explante, principalmente cuando se da el traspaso a medio de elongación. Este factor es un fuerte impedimento para el desarrollo y elongación de los brotes adventicios.
- Se encontró que existe una diferencia significativa en la producción de brotes adventicios por embrión, en función de la localidad de procedencia de las semillas.
- La máxima consolidación de brotes adventicios se da en el segundo y tercer mes de cultivo en todas las poblaciones de *Picea chihuahuana* estudiadas
- El número de brotes por embrión varía significativamente cuando existe una diferencia en edad de la semilla. Se observó favorecido en semillas con 3 años de almacenamiento y la respuesta fue muy escasa en embriones de semillas con 5 años de almacenaje.
- El regulador de crecimiento que logró inducir el enraizamiento fue ANA en concentraciones que van desde 1 hasta 6 mg/l.
- El medio de inducción de raíz (RIM) y el de elongación (REM) propuesto por Dumas y Moteuris (1995), resultó ser el tratamiento más efectivo de los empleados para inducir el

enraizamiento de esta especie.

- La inducción de raíces en los brotes sigue siendo una etapa crítica para concretar la micropropagación de *Picea chihuahuana* sin embargo se vislumbran mayores posibilidades para cumplir este objetivo en futuras investigaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Mexicana de Jardines Botánicos. 1999. **Estrategia de conservación en Jardines Botánicos Mexicanos**. Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.
- Attree, S. M., D. Moore, V. K. Sawhney & L. C. Fowke. 1991. Enhanced maturation and Desiccation Tolerance of White Spruce [*Picea glauca* Voss] Somatic Embryos: Effects of a Non-plasmolysing Water Stress and Abscisic Acid. **Annals of Botany** 68: 519-525.
- Ball, E. 1950. Differentiation in callus culture of *Sequoia sempervirens*. **Growth** 14: 295-202.
- Bergmann, B. A. & A. Stomp. 1994. Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 39: 185-194.
- Beversdorf, W. D. 1990. Micropropagation in crop species. In: **Progress in plant cellular and molecular biology**. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas & J. Van Aartrijk (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Bonga, J. M. & D. J. Durzan. 1982. **Tissues Culture in Forestry**. The Hague: Martinus Nijhoff/ W. Junk Publishers.
- Bommam C. H. 1984. Possibilities and constraints in the regeneration for trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro*. **Physiol. Plant.** 80, 534-540.
- Calixto F. & M. S. Pais. 1997. Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Ait. **In Vitro Cell, Dev. Biol. Plant** 33: 119-24.
- Cronquist, A. 1991. **Introducción a la Botánica**. Ed. Continental. . México. 850p.
- Chalupa, V. 1977. Organogenesis in Norway spruce and Douglas fir tissue cultures. **Commun**

Inst. For. Cech. 10: 79-87.

- Chaparro-Gomez, C. S. 1992. **Factibilidad de la propagación *in vitro* de *Picea chihuahuana***. Tesis de Licenciatura. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. UA Ch. Chihuahua.
- Chávez, V. M., R. E. Litz, M. Monroy, P. A. Moon & A. M. Vovides. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. **Plant Cell Reports 17:** 612-616.
- Cheng, T. 1977. **Recent advances in development of *in vitro* techniques for Douglas fir**. In: W. R. Sdharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock & V. Raghavan (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications**. Ohio State univewrsity Pres. Columbus.
- Devlin, R. M. 1980. **Fisiología Vegetal**. Omega. Barcelona.
- Dodds, J. H. & L. Roberts. 1999. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge University Press. USA.
- Drake, P. M. W., A. John, J. B. Power & M. R. Davey. 1997 Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency *in vitro* rooting of shoots. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 50:** 147-151.
- Dumas, E. & O. Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plan Cell, Tiss. and Org. Cult. 40:** 231-235.
- Ellis, D. D. & D. E. Bilderback. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. **Amer. J. Bot. 76 (3):** 348-355.
- Ewald, D. 1998. Advances in tissue culture of adult larch. **In vitro Cell Dev. Biol. Plant 34:**

325-330.

- Fagerstedt, K. & P. Saranpää & R. Piispanen. 1998. Peroxidase activity, isoenzymes and histological localisation in sapwood and heart-wood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **J. For. Res.** 3: 43-47.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1963 **World Forest Inventory**. FAO. Rome.
- Flick, C. E., D. A. Evans & W. R. Sharp. 1983. **Organogenesis**. In: D.A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato & Y. Yamada (Eds). **Handbook of plant cell culture**. Vol. 1. MacMillan Publishing. New York.
- Fonseca, R. M. 1999. ¿Cuántas especies de coníferas existen actualmente en México?. **Amaranto** 12 (2): 9-12.
- Galindo-Flores, G. L. 1996. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. vía organogénesis a partir de embriones maduros. **III Congreso Nacional de Biotecnología**. 14-18 de Octubre. UACH-ANABAF. Chihuahua.
- García-Campusano, F. T. A. 1999. **Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous**. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala. México.
- George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**. 2° Ed. Exergetics Limited. England.
- Goldfarb, B., M. Howe, W. P. Hackett, & O. Monteuis. 1996. Survival and Growth of eastern white pine shoot apical meristems *in vitro*. **Plant Cell. Tissue and Org. Cult.** 46: 171-

- Gordon, A. G. 1968. Ecology of *Picea chihuahuana* Martínez. **Ecology** **49** (5): 881-896.
- Gresshoff, P. M. & C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Planta** **17**: 161-170.
- Gupta, P., R. Timmis & W. C. Carlson. 1993. Somatic embryogenesis. A possible tool for large scale propagation of forest species. In: S. W. Young, J. R. Liu & A. Komamine (Eds.). **Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants**. Korean Soc. Plant Tissue Culture.
- Harry, I. S. & T. Thorpe. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. **Plan Cell, Tiss. and Org. Cult.** **37**: 159-164.
- Harry, I. S. & Thorpe, T. A. 1999. Clonal propagation of woody species. In: Plant cell culture Protocols. Vol: 111. R. D. Hall. Humana Press Inc., Totowa. N. J.
- Harry, I. S., C. Martinez-Pulido & T. Thorpe. 1995. Plantlet regeneration from mature embryos of *Juniperus cedrus*. **Plan Cell, Tiss. and Org. Cult.** **41**: 75-78.
- Hristoforoglu, K., J. Schmidt, & H. Bolhar-Nordenkamp. 1995. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos.
- INEGI. 1997. **Explotación de pino en el estado de Durango**. México.
- Isikawa, H. 1974. *In vitro* formation of adventitious buds and roots on the hypocotyl of *Cryptomeria japonica*. **Bot. Mag. (Tokyo)** **87**: 73-77
- Jacob-Cervantes, V. 1994. **Estudio isoenzimático de la variación genética en poblaciones naturales de *Picea chihuahuana*, en los Estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León**. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala. México.

- Kohlenbach, H. W. & W. Wernicke. 1978. Investigations on inhibitory effect of agar and fuction of active carbon in anther culture. **Z. Pflanzen-Physiol.** **86**: 463-472.
- Kolevska-Pletikapic, B & Z. Buturovic-Deric. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. **Plant Cell Tiss. and Org. Cult.** **41**: 189-192.
- Laukkanen, H., H. Häggman, S. Kontunen-Soppela & A. Hontola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum** **106**: 337-343.
- Ledig, F. T., V. Jacob-Cervantes, P. D. Hodgskiss. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare mexican endemic, chihuahua spruce, following holocene climatic warmin. **Evolution** **51**: 1815-1827.
- Litvay, J.D., D.C. Verma & M. A. Johnson. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild corro (*Darcus carota* L.). **Plant Cell Rep.** **12**: 385-389.
- Litz, R. E., R. C. Hendrix, P. A. Moon & V. M. Chávez. 1998. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2, 4-d and embryogenic nurse culture. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** **53**: 13-18.
- López- Escamilla, A. L., L. P. Olguín-Santos, J. Marquez, V. M. Chávez & R. Bye. 2000. Adventitious Bud Formation from Mature Embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an Endangered mexican Spruce Tree. **Annals of Botany** **86**:
- López-Escamilla, A. L. 2000. **Organogénesis in vitro y adquisición de la competencia morfogénética a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez (Gymnospermae) especie en peligro de extinción.** Tesis de Doctorado en Ciencias.

- Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Martínes, M. 1942. Una nueva Pinacea Mexicana. *Picea chihuahuana* sp. nov. **Anal. del Inst. de Biol. 13:** 31-34.
- Mata-Rosas, M. 2000. **Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras.** Tesis de Doctorado en Ciencias. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Mohamed, G. H & W. E. Vidaver. 1988. Root production and plantlet development in tissue-cultured conifers. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 14:** 137-160.
- Montes, R. G. 1993. **Guía Metodológica para cultivar in vitro *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii*.** N° 1. SEP-Sub. Sec. Educ. Tec. Agrop.-Instituto Tecnológico Forestal. Durango.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol. 25:** 135-165.
- Nørgaard, J. V. & P. Krogstrup. 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* Lk. **Plant Cell Rep. 9:** 509-513.
- Narvéz, F., J. Sánchez. & A. Olivas. 1983. **Distribución y población de *Picea chihuahuana*.** Nota técnica no. 6. PR-02. INIF-SARH-Centro de Investigaciones Forestales del Norte.
- NOM-059-ECOL. 2000. Norma Oficial Mexicana. Determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. **Diario Oficial de la Nación.**p. 25.
- Ortega, C. 1997. **Comportamiento de varias procedencias de *Picea chihuahuana* Martínez**

en San Juanito, Chih. Informe final del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Patel, K. R. & T. A. Thorpe. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of Lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.). **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 3: 131-142.

Rancillac, M., M. Faye & A. David. 1982. *In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*. **Physiol. Plant** 56: 97-101.

Roca W. M. & L. A. Mroginski. 1991. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones.** Centro internacional de Agricultura tropical. Colombia.

Romeu, E. 1995. Los Pinos mexicanos, record mundial en biodiversidad. **Biodiversitas** 2: 11-15

Rzedowski, J. 1978. **Vegetación de México.** Limusa. México D. F.

Sánchez, C. J. & R. Narváez. 1983. ***Picea chihuahuana* Martínez. Una Conífera en Peligro de Extinción.** Nota técnica N° 5. PR-01. SARH-INIF-Centro de Investigaciones Forestales del Norte.

Sánchez, C. J. & R. Narvaez. 1990. **Plan integral para la protección y fomento de *Picea chihuahuana* Martínez.** In: SARH-INIFAP (Eds.). **Ecosistemas Forestales.** Vol. 1. Organo de Difusión Técnica.

Sánchez-Martínez, G. 1996. Detección de áreas potenciales para la propagación del pinabete espinoso (*Picea chihuahuana* Martínez). **Folleto técnico Núm. 7** INIFAP.

Schenk, R. U. & A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Can. J. Bot.** 50: 199-204.

ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA

- Schuller A., G. Reuther & T. Geier. 1989. Somatic embryogenesis from seed plants of *Abies alba*. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 17: 53-58.
- Schwann, Th. 1939. **Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der structur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen.** W. Englemann & O. Klassiker. Wissenschaften. Leipzig
- Sharp, W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas & S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Hortic. Rev.** 2: 268-310.
- Skoog, F. & C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 118-130
- Stojicic, D., S. Budimir & L. Culafic. 1999. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. **Plan Cell, Tiss. and Org. Cult.** 59: 147-150.
- Street, H. E. 1979. **Embryogenesis and Chemically Induced Organogenesis.** In: W. R., Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock & V. Raghavan (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications.** Ohio State University Press, Columbus.
- Sul, I-W. & S. S. Korban. 1998. Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology** 73 (6): 822-827.
- Sul, I-W. & S. S. Korban. 1998. Influence of bombardment with BA-coated microprojectiles on Shoot organogenesis from *Phlox paniculata* L. And *Pinus pinea* L. tissues. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** 34: 300-302.
- Thorpe T. A. & S. Biondi. 1984. **Fiber and Wood: Conifers.** In: Sharp WR., Evans D. A. Ammirato PV, Yamada Y (Eds). **Handbook of Plant Cell Culture.** Vol 2 (pp 435-470)

- Macmillan, New York.
- Thorpe, 1978. **Frontiers of plant tissue culture**. IAPTC. Calgary.
- Thorpe, T. A., I. S. Harry & P. P. Kumar. 1991. **Application of micropropagation to forestry in Micropropagation**. *In: Deberg & R. H. Zimmerman (Eds.)*.
- Tran Thahan Van, M., H. Chlyah & A. Chlyah. 1974. **Regulation of organogenesis in thin layers of epidermal and sub-epidermal cells**. *In: H. E. Street (Ed.)*. **Tissue Culture and Plant Science**. Academic Press. London.
- Tran Thanh Van, K & H. Trinh. 1978. **Morphogenesis in thin cell layers: Concept, methodology and results**. *In: T. A. Thorpe (Ed.)*. **Frontiers of plant tissue culture**. IAPTC. Calgary.
- Tran Thanh Van, K. 1980. **Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers**. *In: I. K. Vasil (Ed.)*. **Perspectives in plant cell and tissue culture**. *Int. Rev. Cytor. Suppl.* 11^a Ed. Academic Press. New York.
- Tranvan, H. 1979. *In vitro* adventitious bud formation on isolated seedlings of *Pinus silvestris*. *L. Biol Plant* 21: 230-233.
- Vietiez, A. M., Sánchez C & San-Jose C. 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae*. Amsterdam. 41: 151-160.
- Villalobos, V.M., T. A., Thorpe & E. C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo* 51: 43-48; 53-59.
- Villareal-Martínez, S. 1957. **Control de plagas forestales en el Estado de Durango**. Tesis de Licenciatura. Ingeniero Agrónomo (Bosques). Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.

- von Arnold, S. & T. C. Ericsson. 1978. Induction of adventitious buds of Norway spruce grown *in vitro*. **Physiol. Plant** 44: 283-287.
- von Arnold, S. & T. C. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Can. J. Bot.** 59: 870-874.
- White, P. R. 1954. **The cultivation of animal and plant cells**. 2^o Ed. Ronald Press. New York.
- Wook, K., Y., Y. Youn, E. R. Noh & J. C. Kim. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of japanese larch (*Larix leptolepis*). **Plan Cell, Tiss. and Org. Cult.** 55: 95-101.
- Yeoman, M. M., & A. J. Macleod. 1977. **Tissue (callus) cultures-Techniques**. *In*: H. E. Street (Ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. 2d Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

APÉNDICES

1) Medio Shenck y Hildebrandt (SH)*

Macronutrientes

	mg/l
KNO ₃	2500
MgSO ₄ 7H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ 2H ₂ O	200

Micronutrientes

Mn SO ₄ H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.2
FeSO ₄ 7H ₂ O	15
Na ₂ EDTA	20

Compuestos orgánicos

Vitaminas

Tiamina HCl	5
Ac. Nicotínico	5
Piridoxina HCl	0.5

Myo-inocitol	50
Sacarosa	30000

El medio SH 50% (elongación) corresponden los componentes anteriores a la mitad de su concentración.

2) Medio de Inducción de Raíz (RIM)

Macronutrientes del medio Risser y White (1964)

	mg/l
KNO ₃	80
(CaNO ₃) ₂ 4H ₂ O	300
MgSO ₄ 7H ₂ O	740
KCl	65
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	165
Na ₂ SO ₄	200

Micronutrientes de MS al 50%,

Compuestos orgánicos

Myoinositol	50
Glicina	2
Tiamina	1
Piridoxina-HCl,	1
Acido nicotínico	1
Sacarosa	10000
ANA	1
Agar	8000
pH	5.5 - 5.6