



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

“Propagación *in vitro* de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins (Caesalpiniaceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.”

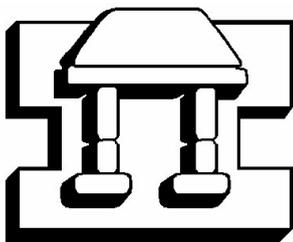
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

GUSTAVO IVÁN LABRADA ARANDA



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ERNESTO AGUIRRE LEÓN

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A las tres personas más importantes en vida: Silvia, Gustavo y Karla. Siempre estaré infinitamente agradecido por el ejemplo de familia que formamos. Ustedes son la base de mis logros, mis metas y mis ganas de vivir.

Papás, realmente no tengo palabras para agradecerles todos los esfuerzos y sacrificios que han tenido que pasar para que sus hijos se superen, se que lo hacen con todo gusto, pero quiero reconocerlos y que sepan que no me habrían podido tocar mejores personas que ustedes para guiar mi vida. Siempre están en mi corazón.

Tonchis, mi compañerita de vida, mi hermanita. Muchas gracias por hacer mi vida tan feliz con tu alegría contagiosa, por tenerme tanta paciencia y por estar conmigo en todo momento. Te quiero muchísimo.

Este trabajo es un logro más que como familia hemos realizado. Vamos por más !!!

Los amo con toda mi alma. I ván

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero expresar mi reconocimiento a la Máxima Casa de Estudios en el país, la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme la oportunidad de poder crecer y desarrollarme profesionalmente.

Asimismo, quiero agradecer a mis revisores de tesis: Dra. Silvia Aguilar Rodríguez, M. en C. Ernesto Aguirre León, M. en C. María Elena Huidobro Salas, M. en C. Josefina Vázquez Medrano y Biol. Marcial García Pineda, por sus comentarios al término de este trabajo.

De manera especial agradezco el apoyo y la amistad brindada durante estos últimos tres años al maestro Ernesto Aguirre, amigo y compañero en toda circunstancia de gran calidad humana.

A la maestra Ma. Elena Huidobro, gracias por compartir sus conocimientos y anécdotas y por todo el apoyo que me demuestran la gran persona que es. Gracias Maestra, la aprecio mucho.

Al maestro José Luis Gama por el enorme compromiso que demuestra en la formación de verdaderos estudiantes y profesionistas. Le estoy sumamente agradecido por el apoyo que me ha brindado y por mostrarme desde otra perspectiva el campo de la biología; indudablemente, ejemplo de tenacidad y ganas de trabajar.

A mi tía Jose, mi tío Abel y su familia, por todo el apoyo brindado a lo largo de esta senda, que no es más que una parte de lo que falta por recorrer. Muchas gracias por confiar en mí, dedico a ustedes también este logro y los considero parte importante de él.

A toda mi familia, mis abuelitas (Irene y Ma. Elena, siempre están en mis recuerdos, tarde o temprano nos volveremos a unir), tíos, tías, primos, primas, sobrinos y demás, que por falta de espacio no me es posible mencionar. A todos gracias por contribuir de alguna manera con el logro de las metas que me he propuesto.

A todos mis compas, tanto de carrera como los del Servicio Social y Laboratorio. He aprendido muchísimo con todos ustedes. Agradezco también a Angélica Galván. Por tu apoyo y todos los momentos que compartiste conmigo a lo largo de la carrera. Gracias por todo flaca.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES.....	4
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS	6
General.....	6
Particulares.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE SEMILLAS DE <i>Parkinsonia praecox</i>	8
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	49
APÉNDICE.....	55

RESUMEN

Los procesos de reproducción natural y de propagación in vitro de *Parkinsonia praecox* requieren atención debido al papel ecológico y usos múltiples que presenta esta especie. Desde el punto de vista ecológico, *Parkinsonia praecox* es un elemento importante en la vegetación, ya que desempeña una función en la modificación del ambiente extremoso y es clave en la reforestación y rehabilitación de suelos degradados. Los usos son variados y van desde ser una planta forrajera, servir como componente de cercas vivas, poseer en su madera propiedades físicas para material de construcción, ofrecer propiedades caloríficas para usarse como combustible, hasta permitir el establecimiento de apiarios en época de floración, etcétera. La micropropagación con especies nativas es una alternativa al método convencional de propagación con el objetivo de incrementar la tasa de multiplicación. En el presente estudio, se evaluó el efecto de algunas combinaciones de reguladores de crecimiento en la formación de brotes a partir de diversos explantes de *Parkinsonia praecox*, así como el enraizamiento y la aclimatización de plantas cultivadas in vitro. La máxima producción de brotes (tres por explante) se obtuvo de un efecto sinérgico producido por la combinación de BA (6-benciladenina) y ANA (ácido α -naftalenacético). Los explantes con mejores respuesta organogénicas fueron los de epicótilo, nudos cotiledonarios y cotiledones, en menor proporción, aunque también con respuestas positivas, los de hipocótilo y hoja. El enraizamiento se presentó con la adición de AIB (ácido indolbutírico) al medio a la quinta semana de cultivo. El porcentaje de sobrevivencia de plántulas cultivadas in vitro a condiciones de invernadero fue de 20% después de cinco meses. El propósito de este estudio fue el de explorar aspectos metodológicos de la propagación in vitro e iniciar sus aplicaciones en relación con reintroducción y aprovechamiento de *Parkinsonia praecox*.

INTRODUCCIÓN

Parkinsonia praecox es un árbol que pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Caesalpiniaceae, se distribuye desde el sur de Estados Unidos y Centroamérica hasta Argentina (Carter, 1974) y en México presenta una amplia distribución. En el Valle de Zapotitlán Salinas, ubicado dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán, Puebla, se encuentra en matorrales xerófilos y bosques tropicales caducifolios a altitudes que van de 850 a los 1115 m. (Burkart y Carter, 1976; Carter, 1974; Dávila *et al.*, 1993).

El interés por esta especie radica en la variedad de usos y bienes que proporciona. Se emplea como planta forrajera, sirve como componente de cercas vivas, posee una madera con propiedades físicas para material de construcción y combustible (Montaño y Monroy, 2000; Paredes, 2001). Permite el establecimiento de apiarios en época de floración (Chifa *et al.* 2000). Otro aspecto importante es la secreción de exudados vasculares (gomas) que pueden ser empleados como sustituto de la goma arábiga, asimismo, este exudado ha sido aprovechado tradicionalmente como planta medicinal para afecciones bronquiales, adhesivo de artículos de cerámica y como pegamento casero por las comunidades campesinas del Parque Chaqueño Seco en Argentina (Alesso *et al.* 2003). También es posible utilizarlo para la obtención de condimentos, en la industria farmacéutica y de envases. Actualmente, la extracción de goma de breá puede ser una alternativa económica competitiva con la goma arábiga (Alesso *et al.* 2003; Anderson *et al.* 1990; Losano *et al.* 2000; Clamens *et al.* 1998; León De Pinto *et al.*, 1994). En la comunidad de Zapotitlán Salinas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, a esta especie se le fomenta por ser hospedera de la larva comestible de un insecto conocido localmente como Cuchamá (*Paradirphia fumosa*: Lepidoptera) (López *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista ecológico, *Parkinsonia praecox* es un elemento importante en la vegetación, ya que por ser una planta freatofita (Pavón y Briones, 2001) desempeña una función en la modificación del ambiente extremoso, característico de las zonas áridas, permitiendo que prosperen especies anuales y herbáceas. Forma islas de fertilidad al crear condiciones ambientales benéficas para otros componentes del ecosistema, como lo es la vegetación asociada. Por lo anterior, esta especie es clave en la reforestación y rehabilitación de suelos degradados, como es el caso de todas las especies, potencialmente rehabilitadoras de la familia de las leguminosas abundantes en el Valle de Tehuacán (Dávila *et al.*, 1993).

Debido a la importancia de *Parkinsonia praecox*, el tipo de manejo de este recurso es un punto clave para su conservación y aprovechamiento. Esta especie ha sido cultivada de manera general a través de semillas; sin embargo, una limitante de este procedimiento es el intenso ataque que sufren las semillas por un insecto barrenador de la familia Curculionidae (Lobo y Flores-Martínez, 2001). En condiciones naturales este tipo de depredación beneficia la germinación de las semillas, ya que actúa como un tipo de escarificación de la testa y es eficaz sólo en aquellas semillas en las que el embrión persiste. En un vivero regional, se ha intentado la repoblación con individuos de esta especie, pero ni el desarrollo ni establecimiento de plántulas en invernadero han sido favorables (Aguirre com. pers.)

En este sentido, la micropropagación con especies nativas puede ser una alternativa al método convencional de propagación con el objetivo de incrementar la tasa de multiplicación. Las principales ventajas de la micropropagación radican en permitir la multiplicación de las plantas y acelerar el desarrollo de especies donde esto es difícil o imposible por medio de técnicas convencionales, lo que aplica también a especies en riesgo de extinción o de gran importancia para el ambiente y el hombre, como es el caso de *Parkinsonia praecox*. Así, el cultivo de tejidos vegetales, es la herramienta con la cual es posible llevar a cabo este tipo de propagación y se inicia comúnmente con pequeños fragmentos u órganos de tejido vegetal aséptico inoculado en un medio nutritivo. Los nuevos brotes o plántulas producidos son reincorporados al ambiente externo y crecidos hasta su madurez. El material vegetal es, en algunas ocasiones, tomado de condiciones naturales de crecimiento (*in vivo*) y cultivado *in vitro*. Cuando el material es cultivado en condiciones *in vitro*, se prepara para condiciones ambientales externas mediante la aclimatización. La propagación *in vitro* de plantas es también llamada *micropropagación* debido a que es necesario manipular pequeños fragmentos o piezas de tejido vegetal para iniciar el cultivo.

ANTECEDENTES

Existe información sobre propagación *in vitro* en diversas especies de leguminosas utilizando varios tipos de explantes. Tal es el caso de *Swainsona salsula* (Yang *et al.* 2001), planta de gran importancia agronómica y medicinal que fue regenerada vegetativamente a partir de explantes de cotiledón; otra especie es *Dalbergia sissoo* (Singh *et al.* 2002), leguminosa de importancia en la industria maderera, en la cual se produjo la organogénesis de brotes a partir de cotiledones semi-maduros y maduros obteniendo así, plantas completas que se establecieron exitosamente en suelo. Otro tipo de explantes utilizados son los fragmentos de entrenudos y de pecíolo en *Calliandra tweedii* (Kumar *et al.* 2002) para la formación de embriones somáticos; además, se han utilizado también fragmentos de hoja en *Cajanus cajan* L. (Eapen *et al.* 1998; Balarama y Padmaja, 2003) con una respuesta regenerativa exitosa.

Continuando con más ejemplos de leguminosas, Jordan *et al.*, (2001) llevaron a cabo la regeneración de *Sophora toromiro* a partir de explantes de meristemos apicales; Tivarekar y Eapen (2001) desarrollaron un método de propagación a gran escala a partir de cotiledones inmaduros de *Vigna radiata*; utilizando explantes de hipocótilo y nudos cotiledonarios, Kaneda *et al.* (1997) implementaron un sistema de inducción múltiple de brotes para soya (*Glycine max*).

En la subfamilia *Mimosoideae* se han logrado establecer métodos de propagación *in vitro* de especies de importancia económica y ecológica, ya sea en la industria maderera, como combustible, como recursos para la obtención de proteínas, taninos, pintura, tinta, condimentos, pulpa de madera, abono verde, gomas, o en la reforestación y rehabilitación de suelos degradados. Vengadesan, *et al.*, (2000) realizaron la micropropagación de *Acacia sinuata* a partir de cultivos de callo obtenidos de explantes de hipocótilo, las plántulas obtenidas fueron establecidas exitosamente en invernadero. Mittal *et al.*, (1989) propagaron *Acacia auriculiformis* utilizando brotes axilares obtenidos de explantes de hipocótilo y cotiledones; Xie y Hong (2001) llevaron a cabo la regeneración *in vitro* vía organogénesis de *Acacia mangium* utilizando explantes de cotiledones, embriones cigóticos maduros, fragmentos de pecíolo y tallos. Bon *et al.* (1998) lograron micropropagar esta misma especie, comparando la capacidad de regeneración con *Paraserianthes falcataria*, a partir de segmentos de entrenudo. *Acacia catechu* es otra especie en la cual fueron utilizados segmentos de nudos para obtener plántulas

in vitro (Kaur *et al.*, 1998). Quoirin *et al.*, (2001) propagaron *Acacia maerensii* a través de segmentos de nudos al igual que las dos anteriores.

Nangia y Singh (1996) realizaron la propagación *in vitro* de *Acacia tortilis* (sombrilla espinosa) a través de nudos cotiledonarios. Ahee y Duhoux, (1994) realizaron la propagación de *Acacia albida* con explantes obtenidos de la raíz de plántulas cultivadas *in vitro*.

Especies pertenecientes a la subfamilia *Caesalpinioideae*, como *Bauhinia vahlii* (Indra y Dhar, 2000; Dhar y Upreti, 1999) y *Ceratonia siliqua* (Romano *et al.* 2002), se han logrado propagar a través de explantes de nudos cotiledonarios y nudos de plantas maduras por proliferación de brotes múltiples.

Los procesos de reproducción natural y de propagación *in vitro* de *Parkinsonia praecox* requieren atención debido a los usos múltiples y características que presenta esta especie. Debido a que hasta el momento parece no haber información de la micropropagación de *Parkinsonia praecox*, esta investigación se realizó basándose en protocolos de propagación *in vitro* de especies que comparten características morfológicas y de hábitat.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de existir información sobre la propagación *in vitro* de especies de la familia Leguminosae, utilizando diferentes tipos de explantes, no se han encontrado antecedentes sobre este tema en especies del género *Parkinsonia*. Siendo *P. praecox* una especie muy importante en la estructura de las comunidades vegetales en el Valle de Zapotitlán-Salinas, principalmente como planta nodriza de cactáceas y suculentas, así como su carácter de especie de usos múltiples y debido a la problemática que presentan las semillas y los individuos jóvenes en el establecimiento y desarrollo en su hábitat natural, se consideró relevante establecer un estudio sobre su micropropagación, con la idea de que pudiera ser útil con fines de aprovechamiento y biorremediación dentro del ecosistema donde habita, por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

General.

- Propagar *in vitro* *Parkinsonia praecox* a través de diferentes explantes cultivados con diversos reguladores de crecimiento.

Particulares.

- Determinar los reguladores de crecimiento que induzcan la organogénesis en los diversos explantes.
- Determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento que produzcan el mayor número de brotes por explante.
- Evaluar el tipo de respuesta producida por las combinaciones y concentraciones de los diferentes reguladores de crecimiento sobre los explantes de *Parkinsonia praecox*.
- Determinar la capacidad regenerativa y eficiencia de los diferentes explantes de *Parkinsonia praecox*.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de plantas de *P. praecox* cultivadas *in vitro* y establecidas en invernadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

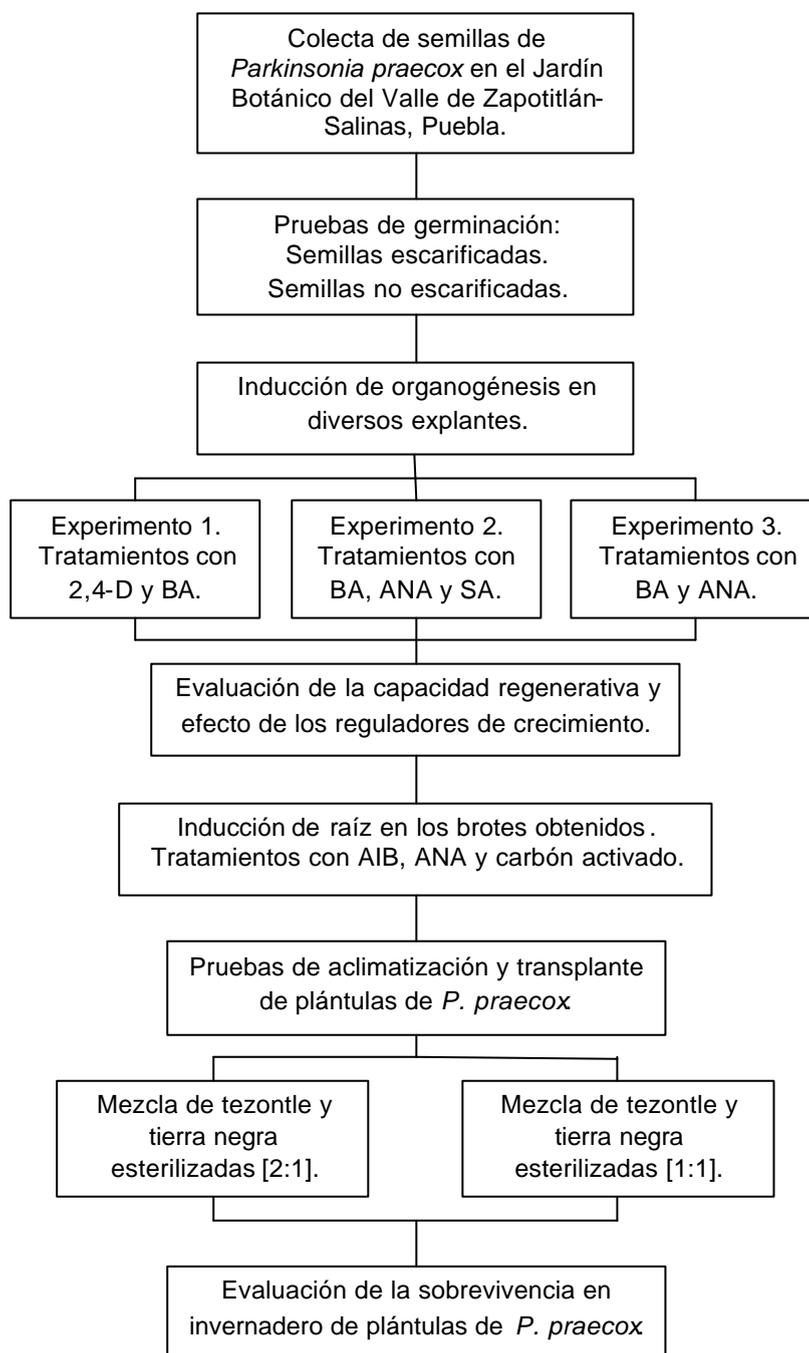


Diagrama del método de propagación *in vitro* para *Parkinsonia praecox*.

Área de estudio y colecta de semillas de *Parkinsonia praecox*

El Valle de Zapotitlán Salinas pertenece a la región fisiográfica del Valle Tehuacán-Cuicatlán, y se localiza en la porción occidental de éste, entre los estados de Puebla y Oaxaca a los 19° 24' 50'' de latitud y a los 101° 27' 30'' de longitud, a una altitud de 1678 m. El Valle de Zapotitlán Salinas comprende una superficie aproximada de 123,619.602 hectáreas. Posee un relieve irregular en múltiples formas como cerros, declives, cantiles, lomeríos, barrancas y terrazas aluviales que tienen la posición más baja en cuanto a altitud, por lo que su topografía es muy variable. Pertenece a la Sierra Madre Oriental, que en esta porción del país se conoce como Sierra de Zongolíca.

El clima de la región corresponde a un BSo hw' (i') que es seco semicálido con una temperatura media anual de 21° C, una precipitación media anual de 400 a 500 mm en sus porciones central y oeste.

El tipo de vegetación dominante es el matorral xerófilo aunque en la parte sur del valle el principal tipo de vegetación es el bosque tropical caducifolio. Este tipo de vegetación está caracterizada por la alta variedad y riqueza de elementos endémicos de valioso rango taxonómico en la flora actual (Dávila *et al.* 1993).

Características de la especie estudiada

La familia Leguminosae tradicionalmente ha sido dividida en tres grandes grupos en base a caracteres morfológicos, principalmente los florales. Las subfamilias más comúnmente reconocidas son Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Leguminosae o Fabaceae) o menos frecuente como tres familias separadas, pero cercanamente relacionadas (Caesalpinioideae, Mimosaceae y Fabaceae). La familia Fabaceae es por lo tanto, la más grande con 476 géneros y cerca de 14,000 especies, la Mimosaceae comprende 77 géneros y cerca de 3,000 especies y finalmente la familia Caesalpinioideae con 162 géneros y aproximadamente 3,000 especies comúnmente de regiones tropicales. La familia Caesalpinioideae tiene gran importancia en ecosistemas tropicales de Sudamérica y particularmente de África, esto se debe a su enorme diversidad de compuestos químicos y a sus diversas morfologías florales (Doyle, 2003). *Parkinsonia praecox* (Ruiz y Pavón) Hawkins (Hawkins *et al.* 1999) (= *Cercidium praecox*) pertenece a esta última familia y crece como un pequeño árbol decídúo en invierno que llega a alcanzar hasta los cuatro metros de altura

(Montaña *et al.* 1997), presenta ramas de un color amarillo verdoso con espinas axilares, las hojas son sésiles o pecioladas bipinadas con 4 pares de folíolos opuestos, las flores son amarillas y el fruto es una legumbre alargada y estrecha. Cada legumbre contiene aproximadamente 5 semillas oblongas, aplanadas de 5 a 7 mm de largo por 3-4 mm de ancho, de color gris-café con un moteado café oscuro y testa gruesa lustrosa (la cual en ocasiones dificulta su germinación si no es adelgazada por un proceso de escarificación natural), florece de marzo a mayo, se ubica entre los 850 y 1115 m. de altitud (Burkart y Carter, 1976; Carter, 1974) (Figura 1). El tronco es de color claro (amarillo limón a ligeramente verdoso), lustre medio, textura fina y es dura y pesada. (Abundiz-Bonilla *et al.*, 2004).



Fig. 1. *Parkinsonia praecox* en época de fructificación, a los costados se muestra la flor y el tronco del árbol.

Sus nombres comunes son Palo manteco, palo verde (Puebla), palo brea (Baja California), palo mantecoso (Oaxaca). En México se distribuye en los estados Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Puebla, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Abundiz-Bonilla *et al.*, 2004). Sus usos son variados, posee una goma con características similares a la goma arábiga que secretan ramas y tronco al presentar alguna lesión. La goma producida por esta especie puede ser utilizada como sustituto de la goma arábiga en la industria de adhesivos, envases, farmacéutica y alimentación (Alesso *et al.*, 2003).

Material vegetal y establecimiento de plántulas

Los explantes fueron tomados de plántulas obtenidas de semillas germinadas en condiciones estériles al término de dos y cuatro semanas de desarrollo. Las semillas fueron colectadas en el Jardín Botánico del Valle de Zapotitlán Salinas, Tehuacán, Puebla. La desinfección y escarificación de éstas se hizo a través de una inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos, posteriormente, se enjuagaron en agua destilada esterilizada.

Pruebas de germinación

Semillas no escarificadas

Antes de colocar las semillas (10 por caja) en los medios de germinación, fueron puestas en una caja petri con algodón humedecido dentro de otra caja petri de mayor diámetro con 100 ml de agua destilada durante 24 horas. Los medios de germinación consistieron en: Agar-agua y MS (Murashige y Skoog, 1962) [5519 Sigma], en dos rangos de temperatura: 25 y 35°C, con fases de luz (fotoperiodo de 16/8 h) y oscuridad (24/24 h).

Semillas escarificadas

Asimismo, se probó un método de escarificación mediante una inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado por 0, 5, 10, 15 y 20 minutos antes de su germinación en el medio MS [5519 Sigma] ½ de su concentración total. La utilización de este último medio fue para obtener plantas de aspecto saludable (Nangia y Singh, 1996).

El pH de los medios fue ajustado a 5.8, solidificado con agar (0.45%) y vaciado a frascos de vidrio de 20 x 10 cm y cajas petri. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C a 1.5 Kg./cm² de presión durante 15 minutos.

Condiciones de cultivo para micropropagación

Los cultivos fueron colocados en un cuarto de cultivo a 30°C con un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad luminosa de 45 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas blancas fluorescentes (Phillips 40W), los explantes fueron subcultivados a medio fresco cada 3 semanas.

Preparación y cultivo de explantes para inducción de organogénesis

Los hipocótilos, cotiledones, hojas, fragmentos de raíz, meristemas apicales, epicótilos y nudos cotiledonarios fueron cortados de las plántulas germinadas *in vitro* con la ayuda de bisturí (No.

3) y un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ645). Los hipocótilos, epicótilos y fragmentos de raíz midieron aproximadamente 5 mm de longitud; el explante de cotiledón fue cortado midiendo 1 cm² a partir del punto de unión con el nudo cotiledonario; el nudo cotiledonario fue tomado del corte de los dos cotiledones y de la unión entre epicótilo e hipocótilo; las hojas fueron cortadas y divididas por pares de folíolos, cada uno con un fragmento de pecíolo.

Medios para inducción de organogénesis

Fueron diseñadas tres series de experimentos para evaluar el potencial regenerativo de los explantes de plántulas de *Parkinsonia praecox* y determinar los reguladores de crecimiento que produjeran una respuesta organogénica.

Primer experimento: Tratamientos con 2,4-D y BA.

A los explantes de hipocótilo, meristemas apicales, raíz y cotiledón de las plántulas descritas fueron aplicados dos tratamientos hormonales: 2,4-D (6,78 µM) y 2,4-D (6,78 µM) en combinación con BA (2,22 µM). Los explantes fueron inoculados en frascos de vidrio (75 x 40 mm.) tapados con aluminio, cada frasco contenía 10 ml de medio MS [5519 Sigma] adicionado con 3% de sacarosa y 0,45% de agar. Se utilizaron seis replicas de cada explante por tratamiento.

Los callos obtenidos fueron sometidos a dos tratamientos más: BA (13.31 µM) en combinación con AIA (3.42 µM) y BA (4.44 µM) en combinación con ANA (2.68 µM). Se les midió el peso fresco utilizando una balanza granataria al término de tres semanas de cultivo.

Con el incremento de masa fresca obtenido de los tratamientos anteriores, los callos fueron cortados en fragmentos de 1 cm², obteniendo material que posteriormente se sometió a dos tratamientos más para inducción de brotes BA (17.76 µM) y BA (17.76 µM) en combinación con KIN (4.64 µM).

Segundo experimento: Tratamientos con diferentes dosis y combinaciones de BA, ANA y SA.

En este experimento se probaron ocho tratamientos y en cada tratamiento se utilizaron ocho réplicas, en explantes de hipocótilo, de hoja, nudos cotiledonarios y epicótilo, como se muestra en la tabla 1.

BA (4.44 μ M) + ANA (0.80 μ M) + SA (80 mg L ⁻¹);
BA (4.44 μ M) + SA (80 mg l-1)
BA (8.88 μ M) + ANA (0.80 μ M) + SA (80 mg l-1)
BA (8.88 μ M) + SA (80 mg l-1)
BA (4.44 μ M) + ANA (0.80 μ M)
BA (8.88 μ M) + ANA (0.80 μ M)
BA (4.44 μ M)
BA (8.88 μ M).

Tabla 1. Composición de los medios aplicados en el segundo experimento utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

Tercer experimento: Tratamientos con diferentes dosis de BA y ANA

Se utilizaron veinticinco réplicas para cada uno de los siguientes tratamientos utilizando explantes de hoja, hipocótilo, epicótilo, raíz, cotiledones y nudos cotiledonarios como se muestra en la tabla 2.

BA (4.44 μ M) + ANA (2.68 μ M)
BA (8.88 μ M) + ANA (2.68 μ M)
BA (23.2 μ M) + ANA (2.68 μ M)
BA (13.9 μ M) + ANA (0.26 μ M)

Tabla 2. Composición de los medios aplicados en el segundo experimento utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

Evaluación de la capacidad regenerativa y efecto de los reguladores de crecimiento.

El efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes fue registrado con la frecuencia del tipo de respuesta (formación de callo y brotes) en valores de porcentaje. El número de explantes utilizados para los tratamientos fue de 25.

Para la determinación de la capacidad regenerativa, se realizaron conteos del número de brotes producidos por cada tipo de explantes, se cuantificó la longitud total del brote, el número de

hojas y fueron medidas a la tercera y cuarta semana de cultivo. Para la medición fue utilizado un Vernier, las unidades empleadas fueron milímetros (mm).

Incremento en el tamaño de los brotes y el número de hojas

Los brotes obtenidos de los experimentos anteriores fueron transferidos a contenedores Magenta con filtro millipore 0.2 μm y medio MS [5519 Sigma] (50 ml) libre de reguladores de crecimiento adicionado con 3% de sacarosa y 0.45 % de agar, la intensidad de luz se incremento de 45 a 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta fase se mantuvo durante dos semanas.

Inducción de enraizamiento

Para esta fase, los brotes fueron sometidos a diversos tratamientos, se probó primero MS [5519 Sigma] a la mitad de su concentración y MS [5519 Sigma] a $\frac{1}{2}$ de su concentración total adicionado con AIB (9.84 μM) y carbón activado, ambos con sacarosa al 2%. Este último con y sin oscuridad. También se utilizó MS [5519 Sigma] a $\frac{1}{4}$ de su concentración, así como MS [5519 Sigma] a $\frac{1}{4}$ adicionado con ANA (1.07 μM). Se utilizaron cinco réplicas de los brotes obtenidos de cada explante por tratamiento.

Tres tratamientos más fueron aplicados, 4.92 y 9.84 μM de AIB en MS [5519 Sigma] a la mitad de su concentración con 1.5% de sacarosa, 0.45% de agar. El tercer tratamiento consistió en sumergir durante tres minutos la parte basal de los brotes en 4,9 mM de AIB y, posteriormente fueron colocados en el medio MS [5519 Sigma] antes descrito. Los brotes fueron mantenidos en oscuridad durante cinco días. Al término de éste periodo fueron colocados en condiciones normales de cultivo.

Pruebas de aclimatización y trasplante para plántulas germinadas in vitro

Para determinar las condiciones de desarrollo *ex vitro* que requerían las plántulas producidas in vitro, se germinaron semillas en las mismas condiciones que las del cultivo de los brotes. Estas plántulas fueron colocadas por dos semanas en envases de polipropileno (Phytacon-Sigma) (Figura 35) y 100 ml de medio MS [5519 Sigma] a $\frac{1}{3}$ de su concentración libre de reguladores de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 h. (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y una temperatura de 30 °C.

Una vez transcurrida esta fase, las plantas fueron llevadas al invernadero, lavando las raíces con agua destilada y transfiriéndolas a contenedores de plástico (50 x 40 x 30 cm) (Figura 37).

Se probaron dos mezclas de tezontle y tierra negra estéril [2:1] y [1:1]. Los contenedores fueron cubiertos con plástico para mantener la humedad en alta proporción (80 % aproximadamente) durante tres semanas.

Posteriormente, las cubiertas de plástico fueron retiradas y el riego se mantuvo cada 5 días. Las plantas permanecieron en estas condiciones por ocho semanas y al término de este periodo se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

Análisis estadístico

Los análisis de varianza (ANOVA de un factor, Excel, 2003) fueron usados para comprobar si existían diferencias significativas entre los promedios obtenidos en los diferentes tratamientos o con los diversos explantes con un nivel de significancia del 5% ($p=0.05$).

RESULTADOS

Germinación

Semillas no escarificadas

Condiciones de oscuridad.

Los mayores porcentajes de germinación se observaron en oscuridad, en el medio Agar-agua y a temperatura de 25°C (32%), seguido por un 22% en el mismo medio a temperatura de 35°C. El porcentaje de germinación para el medio MS a temperatura de 25°C fue la mitad de lo registrado para Agar-agua en la misma temperatura (16%). Este porcentaje disminuyó hasta 4% cuando la temperatura fue de 35°C (Fig. 2).

Condiciones de iluminación.

La germinación fue mayor a temperaturas más cálidas (35°C) y no se observó diferencia por efecto del medio de germinación (14% para ambos). En el medio MS a 25°C se obtuvo el 12% de germinación y para el medio Agar-agua sólo un 6%. (Fig. 2).

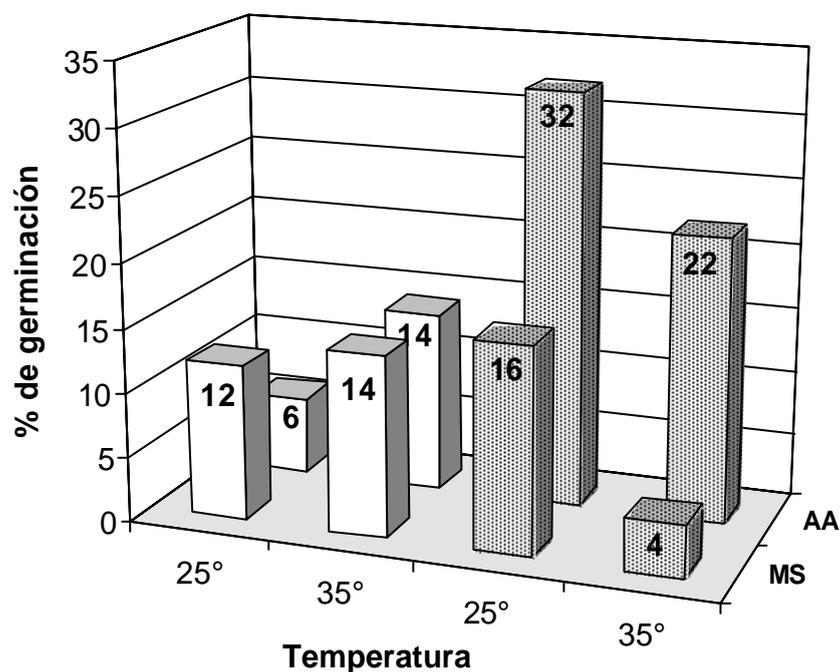


Fig. 2. Germinación in vitro de semillas no escarificadas de *P. praecox* en dos medios de cultivo y dos rangos de temperatura.

□ Condiciones de iluminación. ■ Condiciones de oscuridad.

Semillas no escarificadas

Características de las plántulas germinadas en condiciones de iluminación.

Estas presentaron una apariencia normal; cotiledones grandes de color verde completamente expandidos, hipocótilo erecto, desarrollo de primordios foliares en el epicótilo y raíces largas con crecimiento de raíces secundarias (Figura 3).



Fig. 3. Plántulas desarrolladas en condiciones de iluminación después de dos semanas de cultivo.

Características de las plántulas germinadas en oscuridad.

A diferencia de las plántulas germinadas con iluminación, aquí las plántulas presentaron un alargamiento del tallo con apariencia clorótica y cotiledones doblados. Al ser transferidas estas plantas a medio MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración, presentaron un doblamiento del tallo. El 90% de las mismas no sobrevivieron a transplante en condiciones de iluminación y temperatura de 25°C (Fig. 4).



Fig. 4. Plántulas desarrolladas en oscuridad después de dos semanas de cultivo.

Semillas escarificadas

La germinación en las semillas escarificadas fue total (100%) y se alcanzó al tercer día de incubación. Cabe añadir que estas semillas sólo fueron germinadas en presencia de luz y 25°C de temperatura en medio MS a ½ de su concentración. Las plántulas obtenidas de este tipo de germinación presentaron las características de individuos normales y saludables como los descritos anteriormente (Fig. 3, 6).

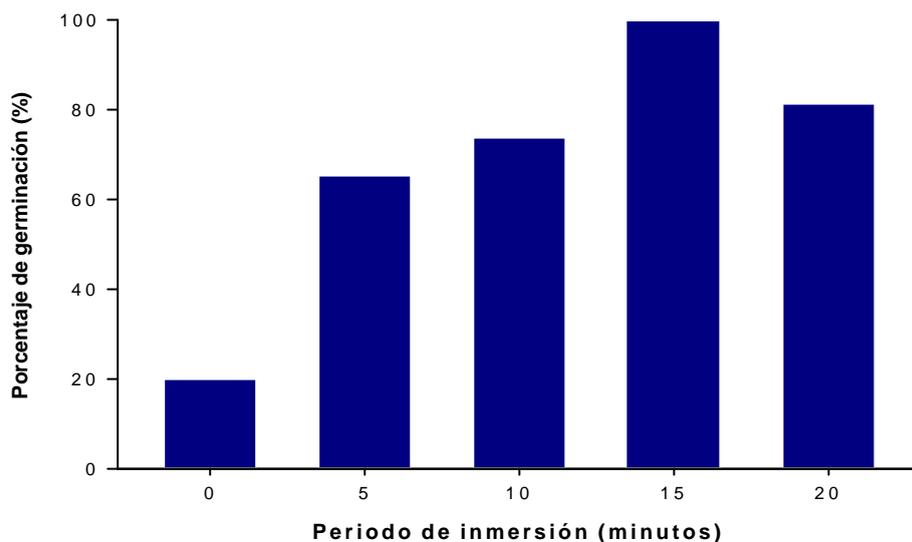


Fig. 5. Porcentaje de germinación de semillas escarificadas de *Parkinsonia praecox* a los cinco días de cultivo después de la inmersión en ácido sulfúrico concentrado.

Las semillas que no fueron sometidas a un tratamiento de escarificación germinaron sólo un 20%, para aquellas que se colocaron en inmersión en H₂SO₄ durante 15 minutos elevaron el porcentaje de germinación a 100% y las de 20 minutos germinaron un 80% (Figura 5).



Fig. 6. Planta de *Parkinsonia praecox* obtenida de semillas escarificadas con ácido sulfúrico durante 15 minutos después de treinta días de cultivo. Se muestra el desarrollo de hojas, tallo alargado, presencia de raíces secundarias y cotiledones extendidos.

Primer experimento: Tratamientos con diferentes dosis de 2,4-D y BA.

En los tratamientos de 2,4-D (6,78 μM) y 2,4-D (6,78 μM) en combinación con BA (2,22 μM) aplicados a los diferentes explantes, se obtuvo formación de callo. Los explantes que presentaron esta respuesta fueron los de hipocótilo y cotiledón, los de meristemos apicales y raíz no produjeron respuesta alguna. Se detectó una ennegrecimiento del medio de cultivo, posiblemente oxidación, más evidente en aquellos con el tratamiento de 2,4-D (6,78 μM).

De los dos tratamientos aplicados en este experimento, el de 2,4-D (6,78 μM) en combinación con BA (2,22 μM) produjo el mayor desarrollo de callo (Fig. 7). Los callos de mayor talla fueron producidos a partir de explantes de cotiledones (Fig. 10)

En el tratamiento de 2,4-D (6,78 μM), los callos fueron de menor talla que los del tratamiento anterior (Figura 9). Los explantes de hipocótilo después de tres semanas de cultivo en este tratamiento no produjeron mayor desarrollo de callo (Figura 8). El uso de 2,4-D produjo callo compacto de color café el cuál no fue organogénico.

Características de los callos formados

Las características que presentaron los callos fueron: color verde brillante, de aspecto nodular o friables para el tratamiento de 2,4-D (6,78 μM) en combinación con BA (2,22 μM) (Figura 7c) y, para el tratamiento de 2,4-D (6,78 μM) la apariencia de los callos fue de color café-amarillento y nodulares (Figura 9).

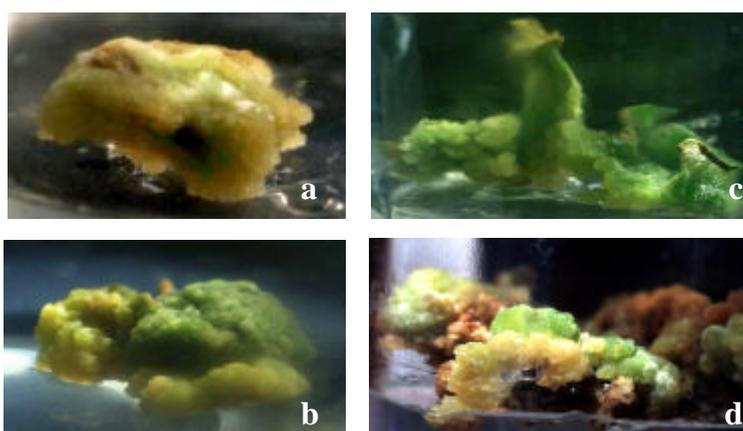


Fig. 7. Callos obtenidos de explantes de *P. praecox* en el tratamiento de 2,4-D (6,78 μM) y BA (2,22 μM). a), b) callo de hipocótilo; c) y d) callo de cotiledón.

Biomasa

En cuanto a la masa de los callos de hipocótilo registrado durante tres semanas de cultivo no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) (Figura 8) para ambos tratamientos, aunque su aspecto fue diferente.

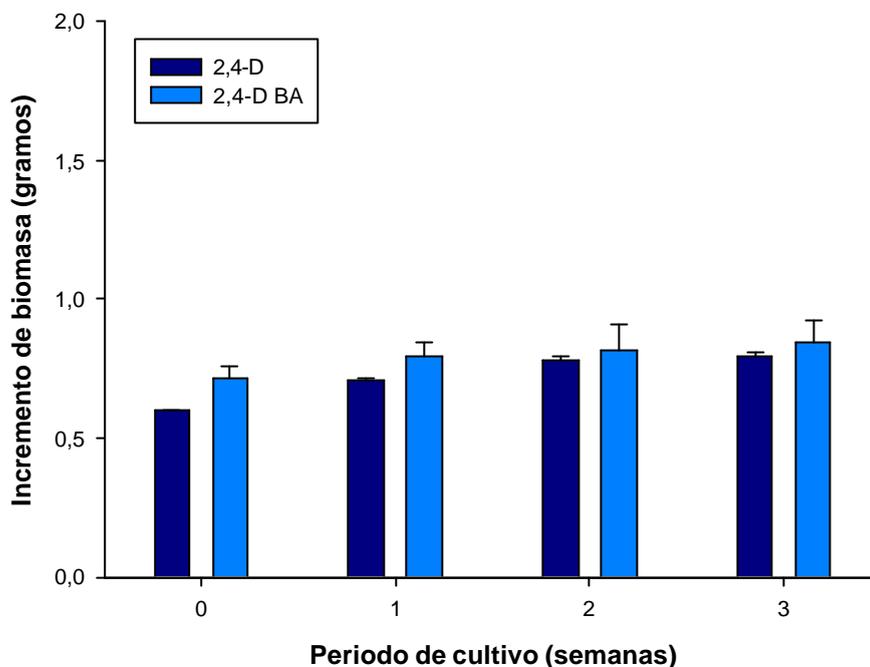


Fig. 8. Incremento de la masa de callos de hipocótilo en ambos tratamientos durante el periodo de cultivo.

El callo producido en 2, 4-D tuvo un incremento en masa hasta la 5ª semana, a partir de aquí la coloración cambió de verde a amarillo hasta alcanzar un tono café y no hubo mayor crecimiento (Fig. 9).



Fig. 9. Callo obtenido en el tratamiento con 2,4-D a partir de un explante de hipocótilo.

En la masa de los callos originados a partir de cotiledón, si se encontró diferencia significativa entre ambos tratamientos al término de tres semanas ($p < 0,05$) (Figura 10).

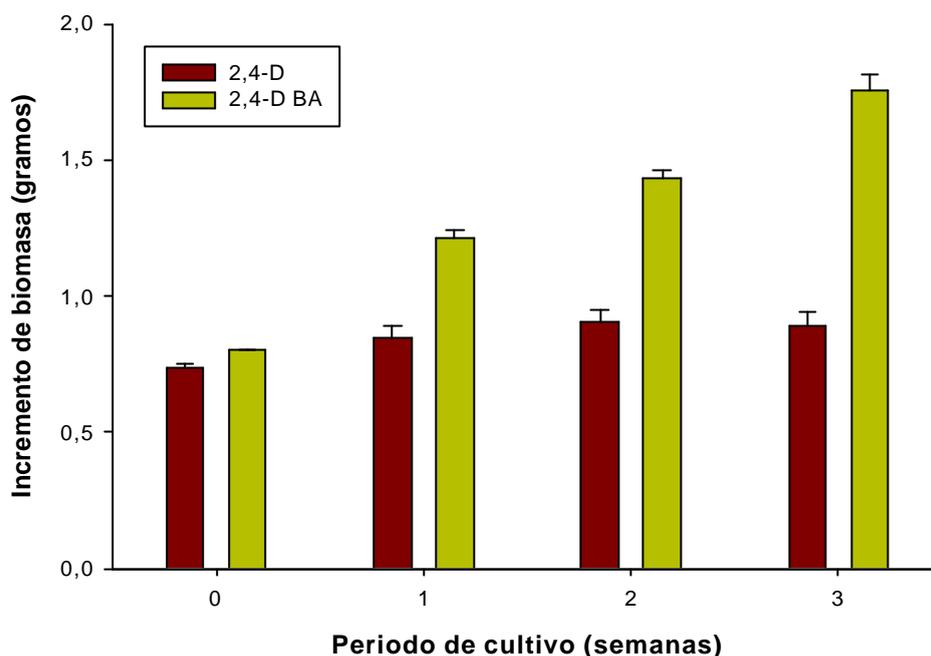


Fig. 10. Peso promedio de callos derivados de cotiledón en los tratamientos de 2,4-D ($6.78 \mu\text{M}$) y 2,4-D ($6.78 \mu\text{M}$) con BA ($2.22 \mu\text{M}$) durante tres semanas de cultivo.

Entre los explantes de hipocótilo y cotiledón se presentó una diferencia en cuanto a producción de masa de callos, ya que en promedio la masa de callo derivado de cotiledón fue dos veces mayor que la registrada para callos provenientes de hipocótilo (Figuras 8 y 10).

En un explante de hipocótilo se produjo el desarrollo de un brote a los nueve días de cultivo, con una talla de 0.92 cm al término de dos semanas. El brote decayó a los 17 días debido a un ennegrecimiento del medio de cultivo, así como del callo presente en la base del brote (Figura 11).



Fig. 11. Brote obtenido a la segunda semana de cultivo a partir de un explante de hipocótilo cultivado en 2,4-D ($6.78 \mu\text{M}$) y BA ($2.22 \mu\text{M}$).

En la mayoría de los medios de cultivo en donde se desarrollaron los callos se presentó un ennegrecimiento (oxidación), al cabo de 7 días, el cual fue evitado mediante el uso de tapas Magenta con filtro millipore (0.2 μm) permitiendo así un intercambio de gases entre el medio de cultivo con el exterior.

Los callos del tratamiento con 2,4-D y BA permanecieron en crecimiento y fueron utilizados para la siguiente prueba experimental.

Los callos anteriores fueron subcultivados en dos tratamientos, uno con BA (13.31 μM) en combinación con AIA (3.42 μM) y otro, con BA (4.44 μM) en combinación con ANA (2.68 μM) permitiendo la regeneración e incremento de peso fresco. En cuanto a desarrollo de callo, ambas mezclas de reguladores de crecimiento produjeron un incremento en masa casi al doble del peso inicial, sin embargo, éste incremento fue más notable en el tratamiento de BA (4.44 μM) en combinación con ANA (2.68 μM) (Figura 12).

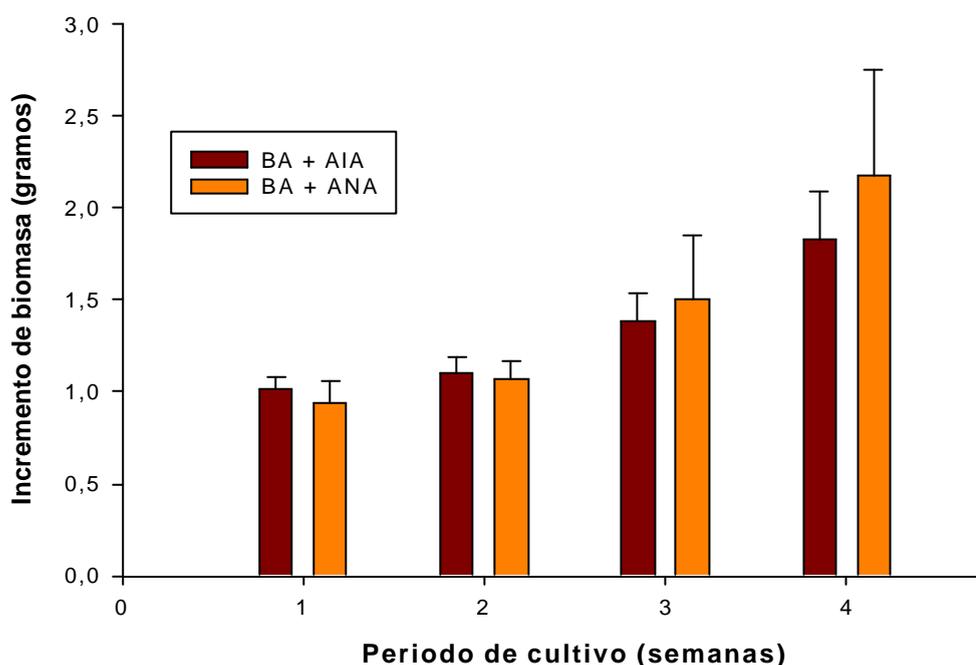


Fig. 12. Incremento de biomasa de los callos expuestos a BA adicionado con AIA y con ANA durante el tiempo experimental.

Los callos aumentados en masa fueron sometidos a dos tratamientos más de BA (17.76 μM) y BA (17.76 μM) en combinación con KIN (4.64 μM), en los cuales se observó el desarrollo de callo nuevo, pero una reducción de su masa, sin que se obtuviera una respuesta organogénica. En la mayoría de los casos los callos presentaron un cambio de color en la periferia, de verde a café-amarillento (Figura 13).



Fig. 13. Callo sometido a BA (17.76 μM) en combinación con KIN (4.64 μM) después de dos semanas de cultivo.

Segundo experimento: Tratamientos con diferentes dosis y combinaciones de BA, ANA y SA.

Se obtuvo el desarrollo de brotes a partir de explantes de hipocótilo, de hoja, nudos cotiledonarios y epicótilo en baja frecuencia.

Hipocótilo

En los tratamientos con BA (4.44 μM) + ANA (0.80 μM) + SA (80 mg l^{-1}), BA (4.44 μM) + SA (80 mg l^{-1}) y BA (8.88 μM) + ANA (0.80 μM) se obtuvo la formación de brotes a partir de explantes de hipocótilo (Figura 14).



Fig. 14. Brotes obtenidos a partir de explantes de hipocótilo en el tratamiento de a) BA (4.44 μM) + ANA (0.80 μM) + SA (80 mg l^{-1}); b) BA (4.44 μM) + SA (80 mg l^{-1}) y, c) BA (8.88 μM) + ANA (0.80 μM).

Las características observadas de estos brotes fueron: color verde claro a verde muy intenso, algunas de las hojas se perdieron y se detectó una hiperhidratación del tejido que causó la pérdida de los brotes.

El mejor desarrollo de brotes se obtuvo con el tratamiento de BA (8.88 μM) en combinación con ANA (0.80 μM), manifestado por un mayor número de hojas, color verde y menor desarrollo de callo (Figura 14c). El tratamiento que produjo menor número de hojas por brote fue el de BA (4.44 μM) + SA (80 mg l^{-1}), en el que el aspecto del material no fue como el descrito para el tratamiento anterior (Figura 14b).

Una vez producidos los brotes fueron separados de los callos y cultivados en MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración. Los callos fueron subcultivados en los medios en que produjeron brotes obteniendo como resultado el surgimiento de más de ellos. Posteriormente, se presentó una fase estacionaria en donde sólo se desarrolló callo (cuarta semana de cultivo).

Hoja

Se obtuvo un solo brote a partir de un explante de hoja en el tratamiento BA (8.88 μM) + ANA (0.80 μM) (Figura 15). Las características de este brote fueron las de un pobre desarrollo de hojas con pecíolos doblados y color verde amarillento.



Fig. 15. Brote obtenido a partir de un explante de hoja en BA (8.88 μM) + ANA (0.80 μM).

Nudos cotiledonarios

Algunos explantes de nudos cotiledonarios produjeron brotes con el tratamiento BA (4.44 μM) + SA (80 mg l^{-1}) (Figura 16).



Fig. 16. Brotes obtenidos a partir de explantes de nudos cotiledonarios en BA (4.44 μM) + SA (80 mg l^{-1}).

Los brotes obtenidos de este tipo de explante produjeron muchas más hojas que cualquier otro explante, varios brotes y en la mayoría el desarrollo de callo fue menor. Los nudos cotiledonarios a pesar de su tamaño fueron los de mejor producción en cuanto a número de brotes por explante se refiere ($3,15 \pm 0,22$ brotes por explante) ($p < 0,05$).

Epicótilo

Un explante de epicótilo desarrolló brote en el tratamiento con BA (4.44 μM) + ANA (0.80 μM). Con este explante se obtuvieron los brotes de mayor talla, así como el desarrollo de hojas completamente extendidas (Figura 17). De igual manera, estos brotes produjeron el menor desarrollo de callo.



Fig. 17. Brote producido por un explante de epicótilo.

La producción de brotes entre los distintos tratamientos mostró diferencias significativas sólo en el caso de los explantes de nudos cotiledonarios ($p < 0,05$). En algunos casos se presentó hiperhidratación, tanto de los brotes como del tejido. Cuando esto ocurrió, se perdieron varios brotes.

Los brotes con mejor aspecto y con menor presencia del fenómeno de hiperhidratación fueron los obtenidos del tratamiento con BA ($8.88 \mu\text{M}$) + ANA ($0.80 \mu\text{M}$).

De manera general, se observa que el tratamiento de BA ($8.88 \mu\text{M}$) en combinación con ANA ($0.80 \mu\text{M}$) fue el que produjo mejores resultados, es decir la combinación de citocinina con auxina en proporciones de [2 : 0.3] respectivamente.

Tercer experimento: Tratamientos con diferentes dosis de BA y ANA.

En los tratamientos de este experimento se obtuvo la formación de brotes en explantes de hoja, hipocótilo, epicótilo y nudos cotiledonarios. Los tratamientos con mayor desarrollo de brotes fueron BA (4.44 μ M) + ANA (2.68 μ M) y BA (8.88 μ M) + ANA (2.68 μ M).

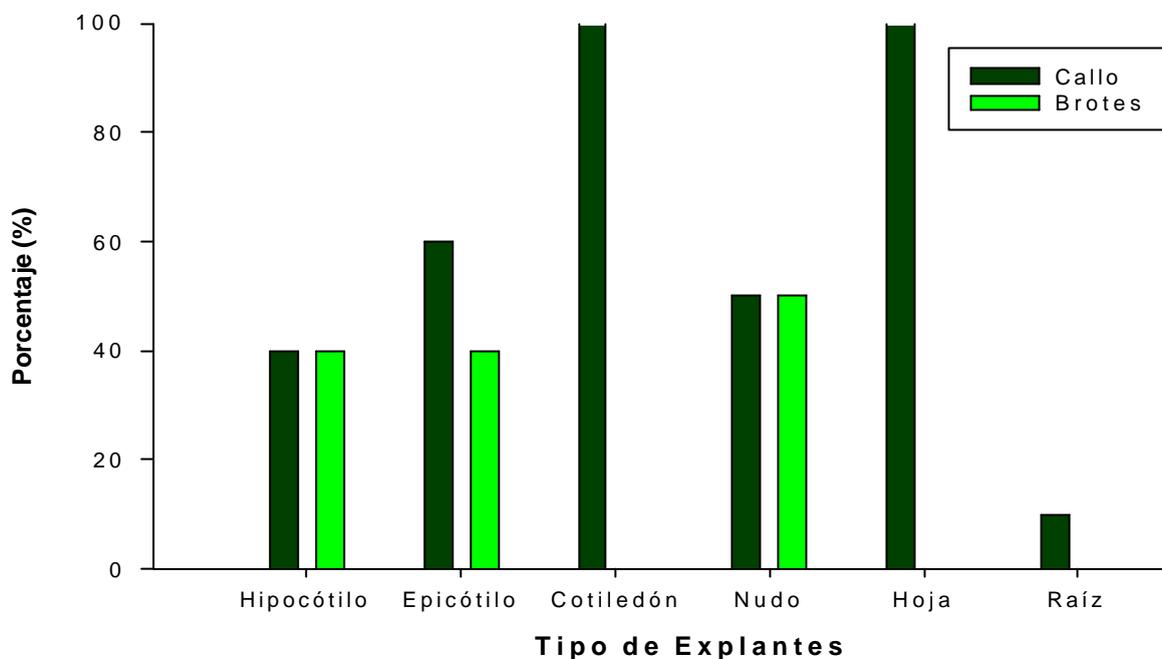


Fig. 18. Porcentaje de callo o brote obtenido de los diferentes explantes de *Parkinsonia praecox* en el tratamiento con BA (4,44 μ M) ANA (2,68 μ M).

Los explantes de hipocótilo, epicótilo y nudo cotiledonario mostraron formación de callo y brotes, resaltando de estos los explantes de nudos cotiledonarios con un 50% de respuesta en ambos casos. Por otra parte, el explante de raíz presentó sólo un 10% de respuesta a formación de callo. Los explantes de hoja y cotiledones sólo produjeron formación de callo (100% en ambos explantes). El mismo porcentaje de brotes se obtuvo de los explantes de hipocótilo y epicótilo (40%) (Figura 18).



Fig. 19. Brotes obtenidos a partir de explantes de nudos cotiledonarios en BA (4,44 μ M) ANA (2,68 μ M).

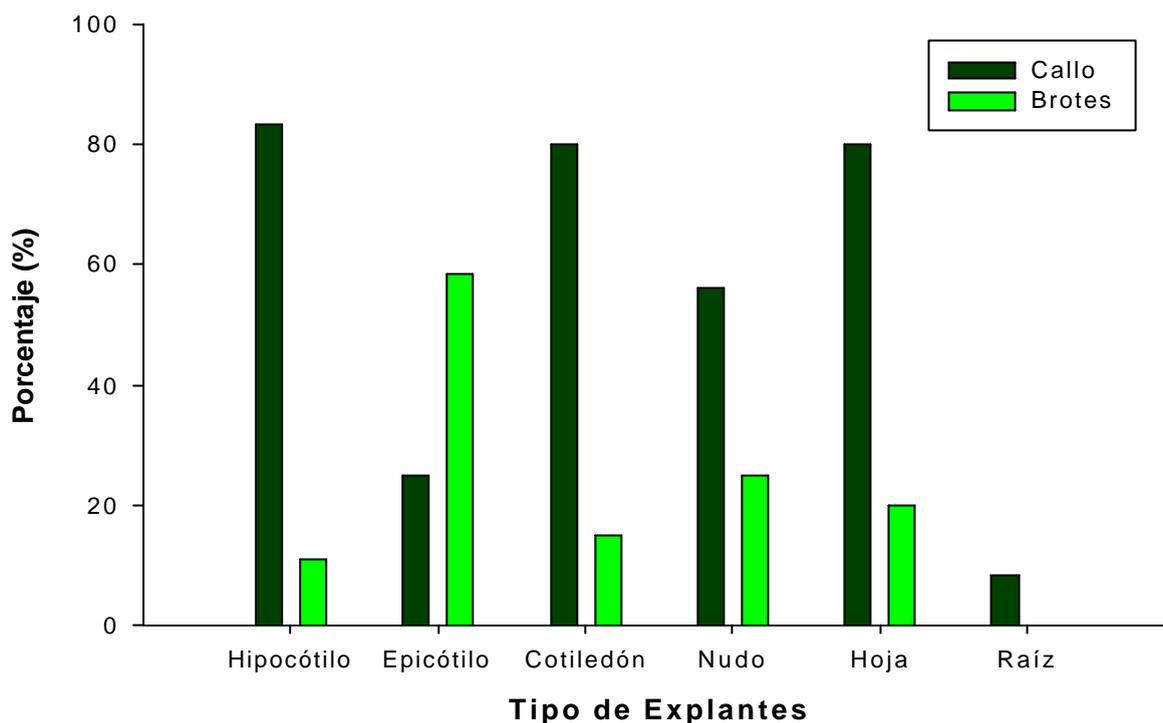


Fig. 20. Porcentaje de callo o brote obtenido de los diferentes explantes de *Parkinsonia praecox* en el tratamiento de BA (8,88 μ M) ANA (2,68 μ M).

La mayoría de los explantes, excepto el de raíz mostraron formación de brotes; con mayor porcentaje el epicótilo (60%), seguido por el explante de nodo cotiledonario (25%) y finalmente el de hipocótilo con 10%. Nuevamente, los explantes de cotiledón produjeron los callos de mayor talla comparado con el resto de los explantes. Los brotes obtenidos en este tratamiento presentaron las características de brotes bien desarrollados, color verde intenso y hojas normales (Figura 21). Durante los subcultivos se observó poco crecimiento de callo.

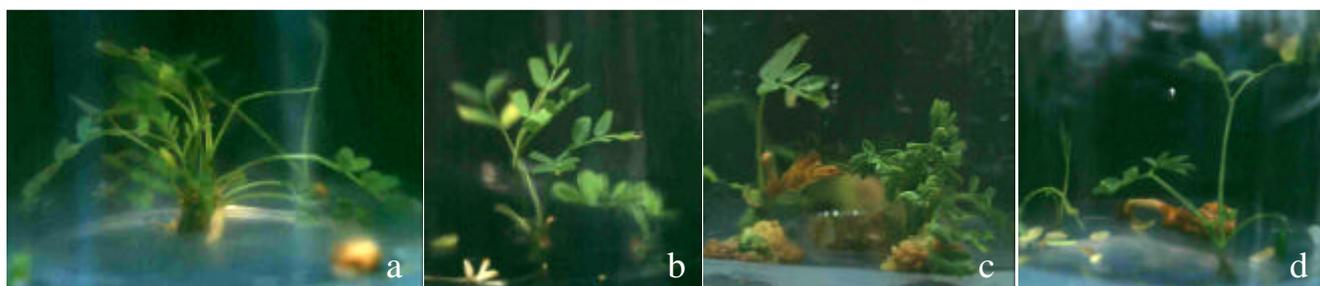


Fig. 21. Brotos obtenidos a partir de explantes de a) epicótilo; b) cotiledón; c) nudo y, d) hoja.

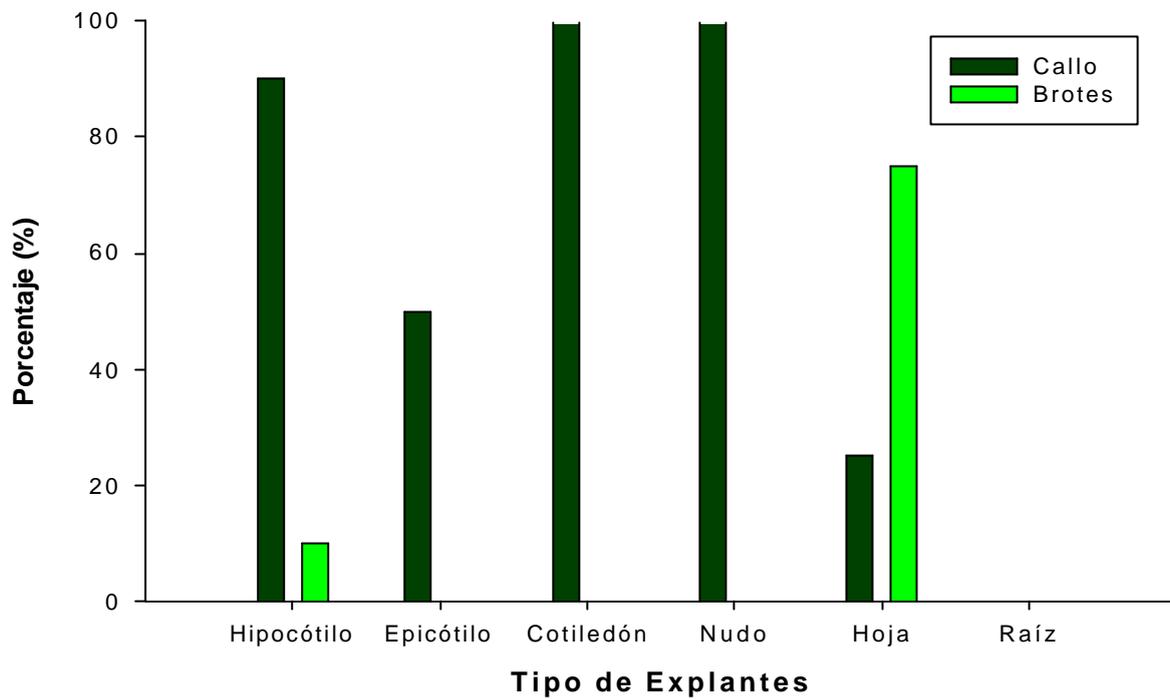


Fig. 22. Porcentaje de callo o brote obtenido de los diferentes explantes de *Parkinsonia praecox* en el tratamiento de BA (4,44 μ M) ANA (0,26 μ M).

El 70% de los explantes de hoja formaron brotes; el 50% de los explantes de epicótilo no presentaron respuesta ante este tratamiento (Figura 22). Los explantes de hipocótilo formaron brotes en un 10% y los explantes de raíz no desarrollaron respuesta alguna.

El subcultivo de los callos formados de explantes de cotiledón condujo solamente al desarrollo de más callo. La talla de los callos de nudos cotiledonarios fue de las menores, comparada con la de los demás explantes.

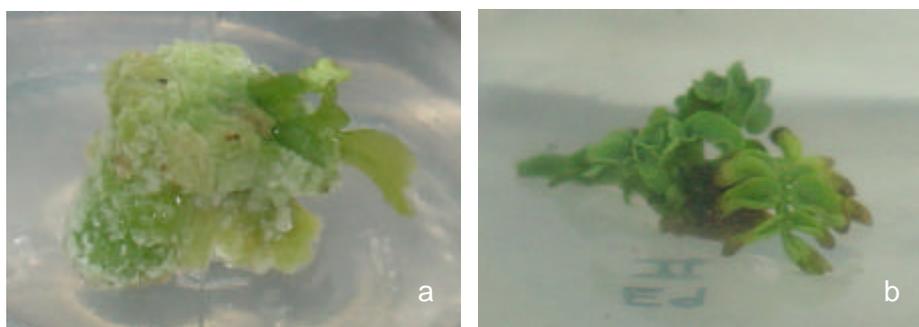


Fig. 23. a). Brotos producido por explantes de hipocótilo. b). Brote obtenido a partir de explantes de hoja.

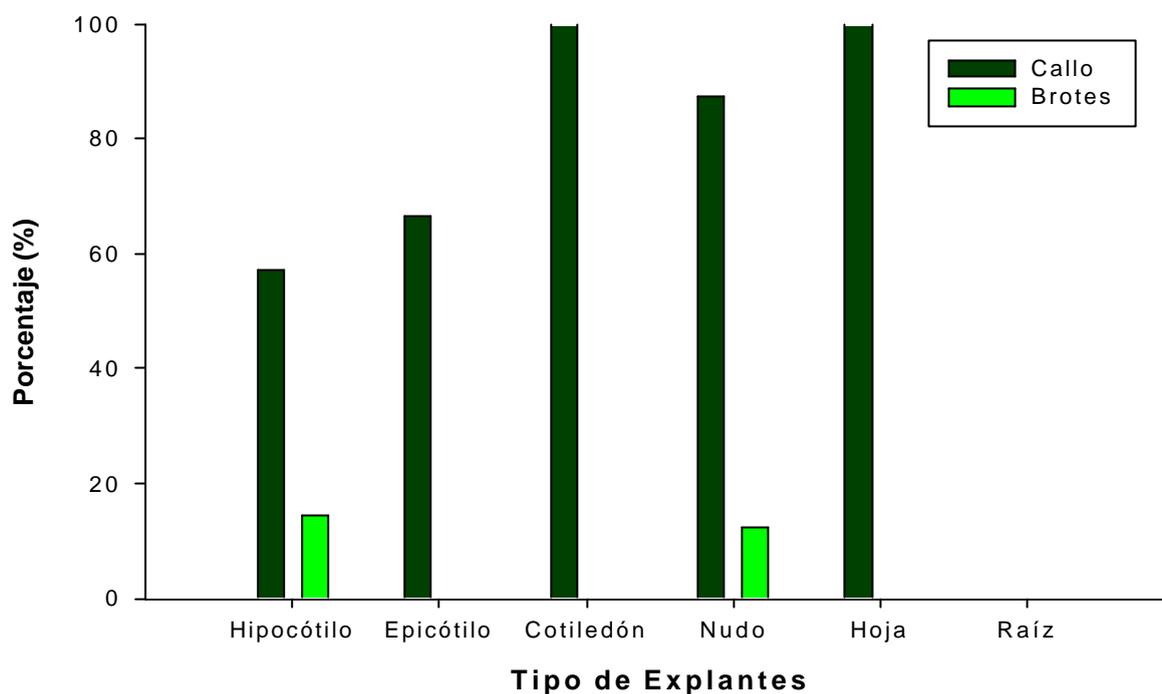


Fig. 24. Porcentaje de callo o brote obtenido de los diferentes explantes de *Parkinsonia praecox* en el tratamiento de BA (8,88 μ M) ANA (0,26 μ M).

Sólo los explantes de hipocótilo y nudo cotiledonario presentaron formación de brotes en 15 y 12%, respectivamente. Los explantes de hoja y cotiledón sólo formaron callo.



Fig. 25. Brotos obtenidos a partir de explantes de hoja en BA (8.88 μ M) + ANA (2.68 μ M).

Los explantes de nudos cotiledonarios en la mayoría de los casos produjeron brotes múltiples y hojas al ser transferidos a medio fresco después del subcultivo.

Curvas de crecimiento de callos de *Parkinsonia praecox*.

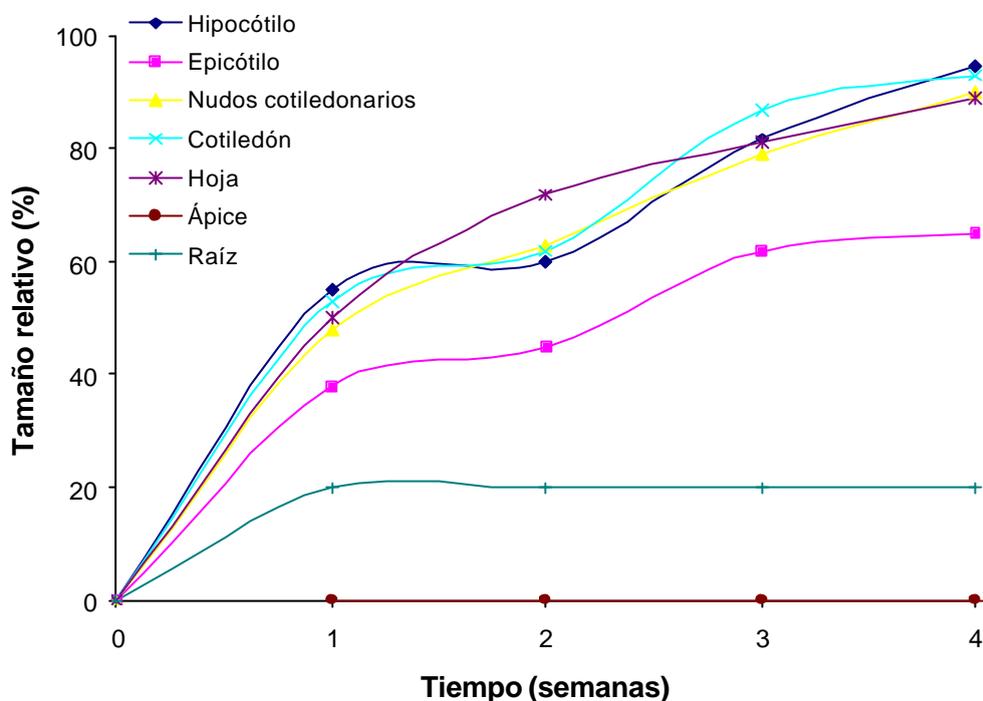


Fig. 26. Curvas de crecimiento de callo en los diversos explantes presentadas en forma general.

Existe un comportamiento similar en el crecimiento de callo entre los explantes de hipocótilo, cotiledón y nudos cotiledonarios, además estos fueron los explantes que mayor masa fresca desarrollaron a lo largo de las cuatro semanas de cultivo.

Se aprecian de manera general tres fases en el crecimiento de los callos, logarítmico, lineal y estacionaria o de senescencia, comunes en el desarrollo vegetal o tisular. Las curvas son de tipo sigmoideal (Figura 26).

A la tercera semana de cultivo se produjo un incremento en la masa de los callos debido al subcultivo que se realizó en la segunda semana para la mayoría de los explantes.

El crecimiento de callo proveniente del explante de hoja fue más constante con respecto al tiempo y a los demás explantes. El explante de raíz sólo presentó dos fases de crecimiento y el de ápice no produjo respuesta a los tratamientos aplicados.

Curvas de crecimiento de brotes de *Parkinsonia praecox*.

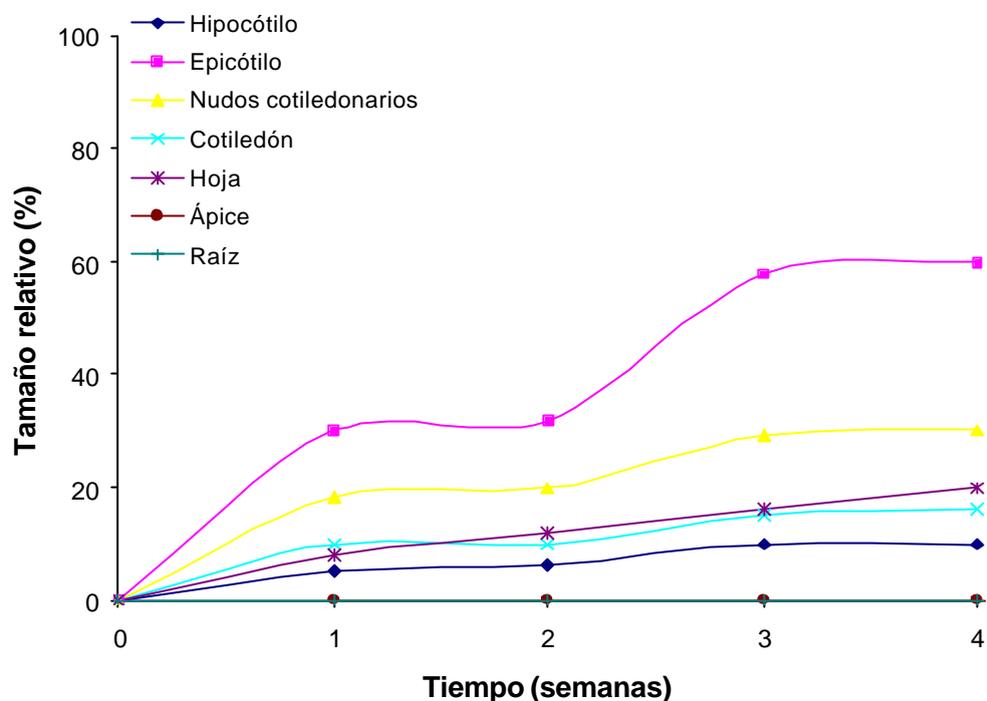


Fig. 27. Curvas de crecimiento de brotes en los diversos explantes presentadas en forma general.

El crecimiento de brotes en el explante de epicótilo fue más notable, presentó una curva de tipo sigmoideal semejante a la descrita por el explante de nudos cotiledonarios.

El patrón de crecimiento del resto de los explantes, excepto de ápice y raíz fue muy similar y no se observaron cambios notables en la producción de brotes a lo largo del periodo de cultivo.

El subcultivo benefició de manera apreciable sólo a dos tipos de explantes (epicótilo y nudos cotiledonarios). Estos últimos son los que mayor desarrollo de brotes produjeron (Figura 27).

Nuevamente, los explantes de ápice y raíz no presentaron desarrollo de brotes con los reguladores de crecimiento aplicados en estos tratamientos.

Capacidad regenerativa

Fase de inducción

Existe una diferencia significativa entre la talla de los brotes ($p < 0,05$), y sólo entre explantes de cotiledón y nudo cotiledonario para el número de hojas por brote ($p > 0,05$) (Figura 28).

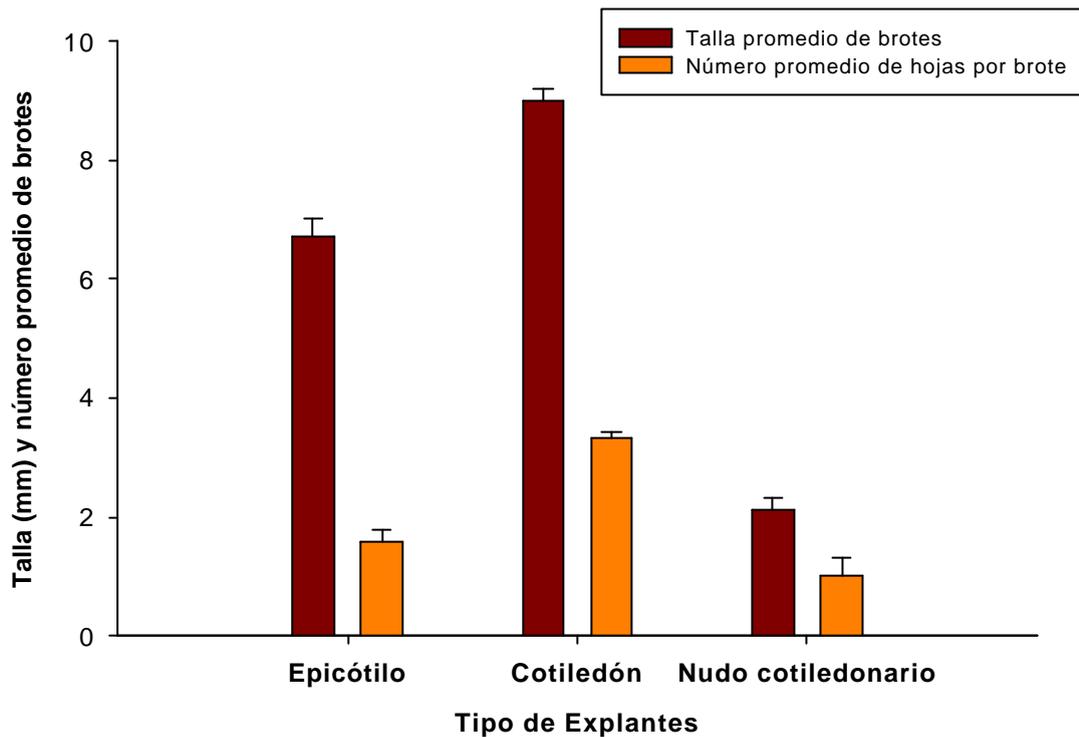


Fig. 28. Capacidad regenerativa de los diferentes explantes al termino de la fase de inducción.

Se tomaron en cuenta sólo los explantes con respuestas más significativamente distintas para cada fase.

La talla de los brotes (9 mm), así como el número promedio de hojas por brote (3) de explantes de cotiledón fueron los mayores al finalizar las dos primeras semanas de cultivo seguido por los de explantes de epicótilo. Los brotes producidos por los nudos cotiledonarios no alcanzaron una talla mayor a 2 mm.

Fase de incremento en tamaño de brotes y número de hojas

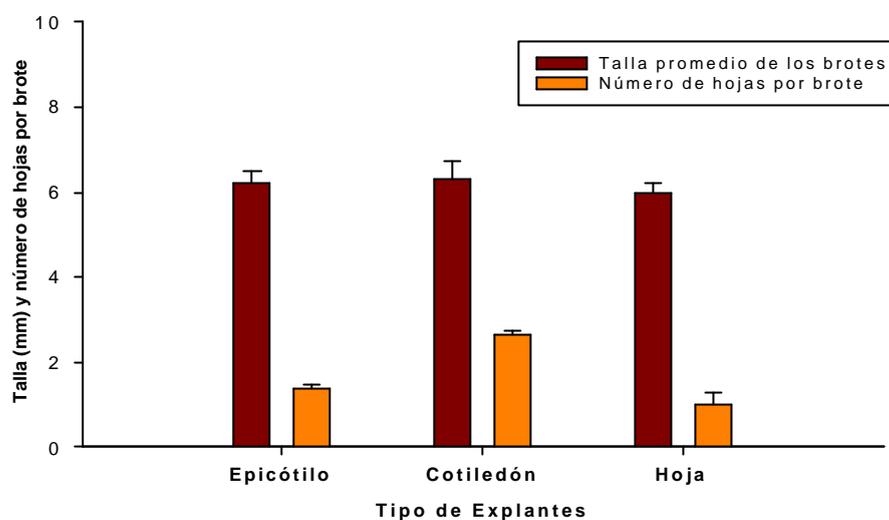


Fig. 29. Capacidad regenerativa de los diferentes explantes durante la fase de incremento en tamaño de brotes y número de hojas.

Durante esta fase, la talla y el número de hojas por brote no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Los brotes obtenidos de los explantes de nudos cotiledonarios no presentaron cambios significativos durante esta fase a los observados en la fase anterior. Al término de la fase de incremento en tamaño de brotes y número de hojas, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la talla de los brotes, excepto en el caso de los provenientes de cotiledón (Figura 29 y 30). No se detectó diferencia significativa entre las características mencionadas ($p > 0,05$).

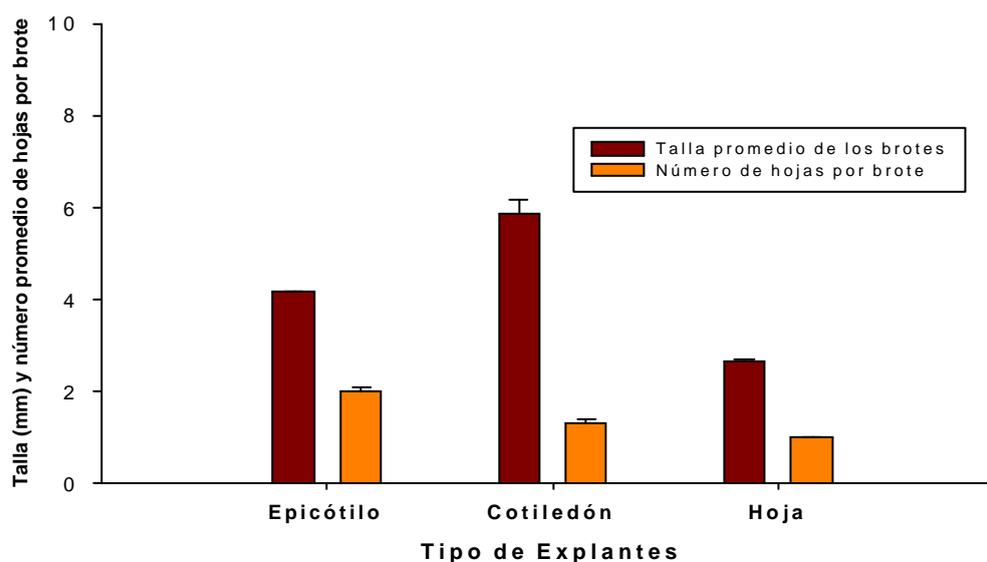


Fig. 30. Capacidad regenerativa de los diferentes explantes al término de la fase de incremento en tamaño de brotes y número de hojas.

Promedio general de brotes producidos por explante

El número de brotes no fue significativamente distinto entre los explantes de epicótilo y nudo cotiledonario ($p > 0,05$), pero comparados con los explantes de hipocótilo y hoja, si existió una diferencia significativa ($p < 0,05$). Los explantes cotiledones presentaron los mayores promedios de brotes por explante.

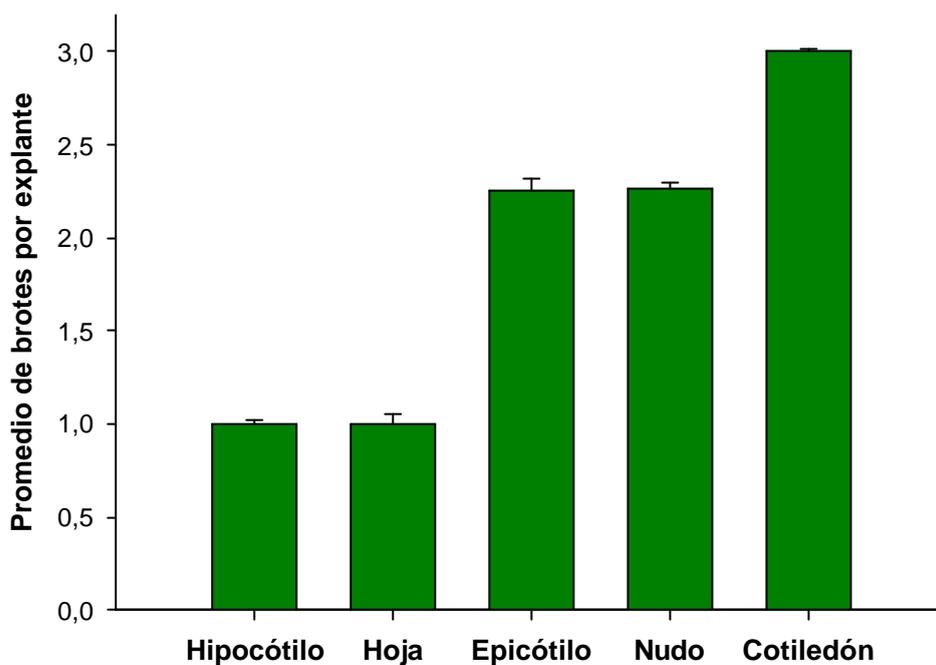


Fig. 31. Número promedio de brotes por explante de *Parkinsonia praecox*.

Los brotes que sobrevivieron a las fases de incremento en tamaño y número de hojas fueron los de epicótilo, nudos cotiledonarios e hipocótilo, el resto decayó debido a la pérdida de hojas o al fenómeno de hiperhidratación. Aquellos que sobrevivieron fueron sometidos a enraizamiento con diferentes tratamientos.

Se realizó un experimento con medio líquido utilizando explantes de ápice y raíz, obteniendo como resultado la formación de callo y posteriormente de un brote por cada explante. El medio consistió en MS, sacarosa 30% y BA (8.8 μM). Los brotes obtenidos de este experimento fueron establecidos en el medio de elongación anteriormente descrito y fueron sometidos a pruebas de enraizamiento (datos no mostrados).

Enraizamiento

En los tratamientos de MS y MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración adicionado con AIB en fase oscura y luminosa, ninguno de los brotes produjo raíces. Los brotes que permanecieron en fase oscura con carbón activado en el medio, presentaron clorosis en las hojas jóvenes, seguida por la abscisión de las mismas, así como un alargamiento del tallo con aspecto ligeramente clorótico (Figura 32).



Fig. 32. Brotes de *Parkinsonia praecox* mostrando pérdida de hojas y alargamiento del tallo en fase oscura.

Los brotes en fase luminosa con carbón activado no mostraron doblamiento de tallos y las hojas no presentaron clorosis (Figura 33). No se presentó crecimiento de los mismos a pesar de tener diferentes concentraciones del medio MS, pero el aspecto de los brotes en fase luminosa fue de color verde intenso. Los brotes decayeron a la tercera semana de cultivo aun cuando fueron subcultivados.



Fig. 33. Brotes de *Parkinsonia praecox* sin pérdida de hojas en fase luminosa.

A diferencia de los brotes sometidos a oscuridad, los de fase luminosa presentaron tallos más verdes y menor pérdida de hojas. No se detectó ennegrecimiento del medio de cultivo cuando se utilizó carbón activado y la formación de callo en la base de los brotes disminuyó.

Para el tratamiento de MS a $\frac{1}{4}$ de su concentración la pérdida de hojas fue más notable (Figura 34a) que en los tratamientos anteriores. En contraste, en MS a $\frac{1}{4}$ de su concentración adicionado con ANA, la pérdida de hojas fue mínima (Figura 34b), pero en ninguno de los casos se presentó la formación de raíces.

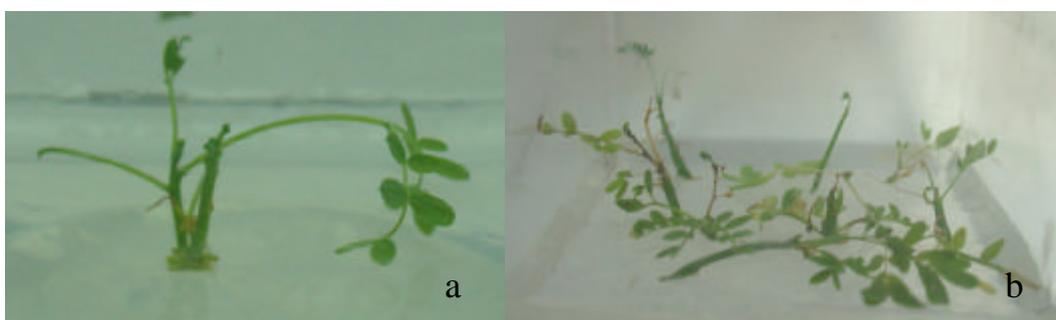


Fig. 34. a) Pérdida de hojas abundante en MS [$\frac{1}{4}$]. b) Menor pérdida de hojas en MS [$\frac{1}{4}$] adicionado con ANA.

En el tratamiento de MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración, adicionado con AIB ($4.92 \mu\text{M}$), se presentó el enraizamiento en un brote proveniente de epicótilo a la 5^a semana de cultivo, el tamaño de la raíz principal fue de 6.6 mm con cuatro raíces laterales de 3 mm aproximadamente. Este brote enraizado se perdió debido a una contaminación en el medio de cultivo.

El tratamiento de inmersión de la parte basal de los brotes en AIB no produjo enraizamiento cuando fueron colocados en oscuridad, sólo alargaron sus tallos.

Las pruebas realizadas en esta fase indican que *Parkinsonia praecox* es una especie de difícil enraizamiento, sin embargo, el uso de AIB indica que este regulador de crecimiento es el que mayores posibilidades tiene de generarlo.

Pruebas de aclimatización

El desarrollo de las plántulas de *Parkinsonia praecox* en los envases de polipropileno (Phytacon-Sigma) fue de apariencia sana, con cotiledones grandes, desarrollaron raíces secundarias y hojas en la mayoría de los casos con 3 ó 4 pares de folíolos. El medio se tornó de color amarillento, pero no afectó el desarrollo de las plántulas.



Fig. 35. Plántulas de *P. praecox* de dos semanas de desarrollo en envases Phytacon-Sigma.

Evaluación del porcentaje de sobrevivencia de plantas de *P. praecox*.

El porcentaje de sobrevivencia de las plantas fue después de cinco meses del 20%.

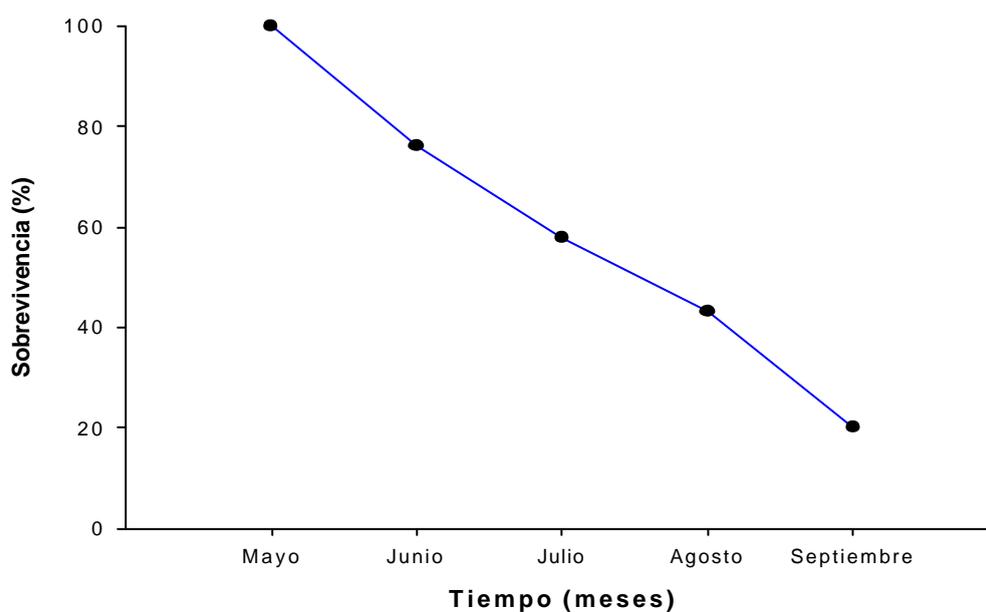


Fig. 36. Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de *Parkinsonia praecox* durante cinco meses en condiciones de invernadero (T. 30°C, FP. 12/12 h.).

En plántulas de *P. praecox* se presentó también pérdida masiva y etiolación de algunos individuos, pero fue solucionada en cierta medida al incrementar de 45 a 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la intensidad luminosa.

Actualmente, las plantas se encuentran en invernadero en contenedores de plástico anteriormente descritos y muestran gran desarrollo de hojas y ramas laterales, así como crecimiento y lignificación de espinas



Fig. 37. Plantas de *P. praecox* en una mezcla de tezontle y tierra negra después de 9 meses de cultivo.

El tamaño promedio de las plantas hasta ahora registrado es de 40 cm aproximadamente. El porcentaje de sobrevivencia disminuyó drásticamente debido probablemente al periodo de 2 semanas de aclimatización en el cuarto de cultivo. La mezcla de tierra que mejores resultados mostró en cuanto a calidad de plantas fue la de tezontle-tierra negra [2:1] (Figura 37).

DISCUSIÓN

Parkinsonia praecox es una especie importante debido a la variedad de usos a que es sometida y también al papel que desempeña en las regiones semiáridas donde habita. La propagación in vitro de este tipo de especies es una herramienta útil con gran potencial para su aprovechamiento.

La germinación total (100%), se obtuvo a temperaturas de 25°C con el método de escarificación con ácido sulfúrico. Los datos obtenidos sugieren que esta especie requiere principalmente de disponibilidad de humedad y que la testa sea adelgazada por algún método de escarificación (químico o mecánico), ya que cuando fue utilizado el método de equilibración por humedad, el porcentaje de germinación alcanzado fue una tercera parte de lo obtenido para semillas escarificadas. También es posible conseguir la germinación en menor porcentaje, equilibrando la humedad interna de las semillas, siendo el proceso de germinación más lento y no uniforme. La germinación de las plántulas de esta especie en su hábitat natural se realiza únicamente en la época de lluvias y en algunos casos este fenómeno se lleva a cabo con la ayuda de un escarabajo barrenador (*Mimosetes amicus*, Lobo y Flores-Martínez, 2001) que perfora y depreda las semillas del árbol, cumpliendo las funciones de la escarificación, siempre y cuando la perforación no haya sido realizada en la región donde se localiza el embrión.

La escarificación con ácido sulfúrico concentrado se realiza debido a que conlleva a una germinación uniforme así como a la desinfección de las semillas en aquellas especies en que la testa de la semilla es gruesa. Este tipo de escarificación ha sido realizada en diversas especies de leguminosas (Jordan *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

El porcentaje de germinación obtenido en este trabajo por el método de escarificación difiere en un 13% con respecto a *Parkinsonia aculeata* (Everitt, 1983). No obstante, ambas especies fueron germinadas en niveles de temperatura similares. Esta disminución en el porcentaje de germinación de *Parkinsonia aculeata* podría deberse a que dicho autor utilizó un tiempo de inmersión en ácido sulfúrico tres veces mayor al utilizado para *P. praecox*. Lo anterior, pudo haber causado daño al tejido embrionario de algunas semillas y por tal motivo, la diferencia en la germinación. Esta suposición se ve reforzada con la prueba de veinte minutos aplicada en este estudio, ya que el porcentaje de germinación disminuyó en un 20%.

El comportamiento de la germinación en los intervalos de temperatura utilizados se modifica cuando se realiza en un medio adicionado con sales de MS. A este respecto, nuestros resultados coinciden con lo registrado por Everitt (1983) quién mostró que concentraciones altas de sales disminuían la germinación de *P. aculeata*. Por el contrario, Choffe *et al.* (2000) mencionan que en *Echinacea purpurea* la adición de sales de MS a la mitad de su concentración y las vitaminas del medio B5, permitieron un 99% de germinación y el establecimiento de plántulas saludables. La adición de sales de MS al medio parece influir de manera positiva en el establecimiento de las plántulas de *Parkinsonia praecox*. Aquellas plántulas germinadas en medios con sales tuvieron las características de las plantas saludables ya mencionadas en la sección de resultados. Los medios con sales proveen los nutrientes necesarios (macro y micro elementos) para el crecimiento a aquellos tejidos u órganos que se encuentran en condiciones artificiales y el éxito de estos cultivos está determinado en gran parte por la naturaleza del medio utilizado (George, 1993). Sin embargo, es posible que para esta especie la adición de sales en la germinación no sea un factor limitante en el establecimiento de las mismas, siempre y cuando sean sometidas a condiciones normales de iluminación (fotoperiodos de 16/8 h).

La germinación de las semillas en oscuridad en medio libre de sales desarrolló plántulas con síndrome de etiolación, las cuales no pudieron recuperarse al colocarlas en condiciones normales de iluminación. Los datos reportados en la literatura con algunas leguminosas en las que se ha manifestado la etiolación de tejidos o de plántulas, la mayoría de ellas se recupera cuando son expuestas a luz. En este caso, probablemente el periodo de oscuridad a que estuvieron sometidas produjo un efecto de etiolación irreversible. Algunos autores utilizan este tipo de plántulas como fuente de explantes para promover la inducción de raíces principalmente (Choffe *et al.* 2000; Monteuuis y Bon, 2000), pero en este caso no respondieron en los medios de cultivo utilizados.

El éxito en el cultivo de tejidos y la regeneración vegetal comúnmente depende del genotipo de la planta, la fuente y la etapa de desarrollo del explante utilizado, así como las condiciones de cultivo (Jain, 1997; George, 1993; Salisbury y Ross, 1992). Los resultados arrojados por este estudio demuestran que la organogenesis fue indirecta. Con respecto a esto, George (1993) menciona que cuando ocurre este fenómeno es probable que hayan sido utilizados medios y

reguladores de crecimiento que favorecían el rápido crecimiento celular, ya que no condujeron a la iniciación de brotes o raíces en primera instancia (organogénesis directa).

Las respuestas obtenidas por los explantes en el primer experimento son muy similares a las obtenidas por Vengadesan *et al.* (2000). El patrón de crecimiento de los callos fue muy similar al de *Acacia auriculiformis* y *Acacia sinuata* (Rangao Rao y Prasad, 1991 y Vengadesan *et al.* 2000). Vengadesan *et al.* (2000) no obtuvieron formación de brotes con los tratamientos ocupados en el primer experimento de este estudio. Caso contrario se presentó en un explante de hipocótilo de *Parkinsonia praecox*, en donde la formación de un brote fue evidente. Otro punto relacionado con la obtención de callos fue que el máximo desarrollo lo obtuvieron en un periodo de 20-25 días, mientras que la especie en estudio sólo requirió la mitad del tiempo reportado para *Acacia sinuata*.

De los estudios realizados en diferentes leguminosas, se ha observado que una concentración baja de 2,4-D en combinación con una citocinina (BA), [0.5:2] en proporción, es eficiente en la formación de callo, y la subsiguiente proliferación y diferenciación de brotes a partir de dichos callos (Gharyal *et al.*, 1993; Hoque y Mansfield, 2004; Vengadesan *et al.*, 2000). No obstante, se sabe que 2,4-D es una auxina sintética que en altas concentraciones tiene una función herbicida y debido a su elevada fitotoxicidad contra plantas dicotiledóneas principalmente, es utilizada con frecuencia en leñosas perennes (Salisbury y Ross, 1992). De lo anterior y con los resultados obtenidos se percibió que aunque si se presentó el efecto común de auxina formando tejido desdiferenciado (callo), éste no fue organogénico, quizás porque de alguna manera el tejido se vió afectado y no presentó la inducción de brotes. A diferencia de esto, la respuesta de 2,4-D en combinación con BA fue distinta, al parecer se presentó un efecto antagónico cuando la citocinina fue adicionada, debido a que el callo producido en este tratamiento fue organogénico en un explante de hipocótilo.

Con respecto a la capacidad regenerativa de los diversos explantes, se ha demostrado que las células contenidas en la región de los cotiledones poseen una tasa regenerativa elevada y exhiben una actividad organogénica tanto de formación de brotes, así como de raíces en cultivo (Choffe *et al.*, 2000). Esto coincide con nuestra respuesta y explica el porque el explante de cotiledón fue el que produjo mayor masa en el primer tratamiento y uno de los mayores promedios en brotes por explante en la organogénesis.

El ennegrecimiento del medio, así como del tejido basal de los explantes en contacto con el medio, es un fenómeno común en el cultivo de tejidos. Se presenta debido a que algunas plantas poseen altas concentraciones de sustancias fenólicas, las cuales son oxidadas y se liberan cuando las células son dañadas o están senescentes. En *Acacia catechu* este fenómeno se evitó con la adición al medio de ácido ascórbico (antioxidante) para impedir la filtración de dichos compuestos, el problema fue resuelto adicionando glutamina (Kaur *et al.*, 1998). En los cultivos de *P. praecox* se proporcionó un ambiente con intercambio de gases mediante la utilización de tapas con filtro que evitó el ennegrecimiento de tejidos, la clorosis y abscisión de hojas y se cree que también la síntesis y liberación de algunos compuestos fenólicos y etileno (Salisbury y Ross, 1992). Un adecuado intercambio de gases es esencial para asegurar una rápida tasa de multiplicación en tejidos cultivados (George, 1993).

En la producción de brotes de *P. praecox*, BA fue un regulador de crecimiento fundamental para organogénesis, ya que en ausencia de ella no se produjeron. Con *Acacia maernsii* (Huang *et al.*, 1994) se presentó lo contrario, la citocinina BA no influyó significativamente en la multiplicación de brotes. BA es un regulador de crecimiento que posee la característica de inducir la citocinesis principalmente en regiones meristemáticas y ayuda a romper la dominancia apical presente en la mayoría de las plantas (Salisbury y Ross, 1992).

La combinación de citocinina-auxina en proporciones [2:1] ha sido efectiva para un gran número de especies de leguminosas, entre ellas *Acacia mearnsii*. Para esta especie Huang *et al.*, (1994) describieron un sistema de micropropagación donde la formación múltiple de brotes fue promovida por una combinación de los reguladores anteriores. Asimismo, la proporción de citocinina utilizada en la formación de brotes en *Parkinsonia praecox* fue mayor que la de auxina. Skoog y sus colegas encontraron que si se mantiene una relación alta de citocinina a auxina, se producen células meristemáticas en el callo; estas células se dividen y generan otras que se desarrollan para formar brotes, tallos y hojas. Pero si se reduce la relación de citocininas a auxina se favorece la formación de raíces (Salisbury y Ross, 1992; George, 1993). Este postulado no se cumple de manera general, ya que en algunas especies de acacias la regeneración se llevo a cabo sólo con auxinas (Mathur y Chandra, 1983; Jones y Smith, 1988).

Frecuentemente, se requiere una combinación de dos o más compuestos de hormonas distintas, aplicadas de forma simultánea o en secuencia, y existe generalmente un periodo de retraso antes de que el efecto del tratamiento sea aparente. La capacidad de los callos de

regenerar plantas completas representa una herramienta muy útil en la ingeniería genética y en la conservación. Sin embargo, se corre el riesgo de obtener plantas genéticamente distintas debido a la desdiferenciación de las células (posibles mutaciones en el ADN).

Algunos autores como Kaur *et al.*, (1998), Barve y Mehta (1993) con *Commiphora wightii*; Vengadesan *et al.* (2000) en *Acacia sinuata* utilizaron después de la fase de inducción, medios de cultivo que contenían diversas combinaciones de reguladores de crecimiento, entre ellos BA, cinetina y otras citocininas, en algunos casos combinados con diferentes auxinas, esto produjo en la mayoría de los casos brotes más sanos y robustos que los obtenidos sin estos tipos de medios. También observaron regeneración a partir de los brotes ya existentes. En nuestro caso esta etapa se realizó sometiendo a los brotes únicamente a las sales contenidas en el medio MS sin la presencia de reguladores de crecimiento, lo que produjo brotes de apariencia saludable. Es probable que los brotes de *P. praecox* puedan ser regenerados nuevamente a partir de los ya formados si al medio de elongación se le adicionarán reguladores de crecimiento como en las especies anteriormente mencionadas, esta podría ser una alternativa a probar en estudios posteriores.

Los reguladores de crecimiento que mejor funcionaron en la producción de brotes de *Parkinsonia praecox* presentaron un efecto sinérgico, debido a que BA aplicado sin ningún otro regulador forma sólo un brote por explante y ANA aplicado a los explantes sin otra hormona, sólo forma callo, pero si ambas son adicionadas al medio de cultivo, el número de brotes se incrementa hasta 3 por explante. Resultados similares en la combinación de BA y ANA han sido obtenidos por diversos autores como Kaur *et al.*, (1998) en *Acacia catechu*; Swamy *et al.* (1992) para *Dalbergia latifolia* y Purohit *et al.* (1994) en *Wrightia tomentosa*, Polanco y Ruiz, (1997) en *Lens culinaris*, Vaquero *et al.*, (1993) en *Phaseolus coccineus*, todos ellos con concentraciones y proporciones de reguladores de crecimiento más o menos semejantes a las utilizadas para *Parkinsonia praecox*.

Las tasas de multiplicación de brotes en *P. praecox* fueron variables comparadas con las de otras especies; Kaur *et al.*, (1998) obtuvieron en *Acacia catechu* una tasa tres veces mayor a la obtenida para *P. praecox*; probablemente este resultado este relacionado con la cantidad de citocinina que utilizaron, ya que fue cuatro veces mayor que la nuestra. En cambio, Correia y Graça (1995) obtuvieron tasas de multiplicación similares a nuestros resultados en *Acacia mearnsii*, pero el proceso de micropropagación fue limitado debido a la clorosis foliar, seguida

por la necrosis de la planta; aspectos que en algunos casos fueron similares en *P. praecox*. Polanco y Ruiz (1997) mostraron que los meristemos apicales de *Lens culinaris* tuvieron valores bajos de regeneración de brotes utilizando BA como promotor de la organogénesis, en este caso sólo un ápice sometido a un tratamiento en medio líquido produjo un brote. En *Acacia sinuata* obtuvieron hasta 20 plantas por explante (Vengadesan *et al.*, 2000).

La formación de brotes en *P. praecox* se inicio en los primeros tres días de cultivo en comparación con *Acacia sinuata* que fue en menos de dos semanas (Vengadesan *et al.*, 2000) y en *Sesbania sesban* y *Prosopis cineraria* que fue de los 25 a los 30 días de cultivo (Goyal y Arya, 1981; Kathar y Mohan Ram, 1982). Estos datos muestran que *P. praecox* probablemente sea una especie muy sensible a los reguladores de crecimiento y debido a ello se presento la rapidez en su respuesta.

En algunas especies se han adicionado al medio de inducción algunos complementos para incrementar la formación de brotes, ejemplos de esto son el hemisulfato de adenina SA y glutamina (Kaur *et al.*, 1998). De ellos, la adición de SA al medio de inducción no produjo una diferencia notable en los tratamientos experimentales. De tal manera, se confirma una vez más que los reguladores de crecimiento no son absolutos ni específicos.

Con respecto a la talla de los explantes utilizados para micropropagación, quizás el de los ápices y raíces haya influido en la organogenesis de los mismos en los medios semisólidos, debido a que explantes de mayor talla sobreviven mejor la transferencia de las condiciones in vitro: comienzan más rápido su crecimiento, y contienen en algunos casos más yemas axilares (George, 1993). Sin embargo, el primer tipo de explante es comúnmente utilizado para obtener plantas libres de patógenos o enfermedades.

Un gran número de factores puede influir en el proceso de enraizamiento, esta inducción generalmente es regulada por un balance entre reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas en general) y por diferencias en niveles endógenos de reguladores de crecimiento entre explantes (Blakesley, 1994). También, puede explicarse con la determinación de niveles elevados de enzimas degradadoras de auxinas como lo es la AIA oxidasa (Olvera, en prensa).

El porcentaje de inducción de raíces en *Parkinsonia praecox* fue pobre en comparación con el número de brotes enraizados producidos en otras especies utilizando AIB. En *Acacia mearnsii*,

Quoirin *et al.* (2001) utilizaron explantes nodales y la misma auxina en concentración similar a la usada para esta especie. Asimismo, Choffe *et al.* (2000) produjeron raíces con explantes expuestos a concentraciones iguales y al doble para la especie estudiada al igual que en *Sophora toromiro* (Jordan *et al.*, 2001). Por otra parte, *Echinacea purpurea* no requirió de auxinas exógenas para la inducción de raíces (Choffe *et al.*, 2000). El periodo de enrizamiento es casi similar en estas especies (de 1-2 meses). Olvera (en prensa) considera que *Parkinsonia praecox* es una especie de difícil enraizamiento, lo cual concuerda con nuestros resultados. Obtuvo sólo el 8% de enraizamiento con AIB y *p*-nitro-fenil indol 3-acetato en estacas de individuos adultos. La mayoría presentó formación de meristemas radiculares sin elongación ni crecimiento de las raíces, lo que atribuye a la elevada actividad de AIA oxidasa. La auxina AIA inhibió la formación de raíces adventicias.

El ácido indolbutírico AIB se utiliza para inducir la formación de raíces aún más a menudo que ANA o cualquier otra auxina (Salisbury y Ross, 1992; Choffe *et al.*, 2000). Aunque AIA es la auxina que se presenta en forma natural, también es la que se degrada con mayor rapidez en el medio, y este proceso de degradación acelera aún más si se expone a la luz o si el medio contiene sales de MS. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez al AIB-aspartato y al menos a otro compuesto conjugado con un péptido. La formación del conjugado almacena al AIB liberándolo gradualmente hasta llegar a un nivel adecuado de concentración de hormona, especialmente en los estadios finales de la formación de raíz.

Se ha supuesto que existe una inhibición de las auxinas causada por etileno. Dichas auxinas estimulan la producción de etileno en muchos tipos de células vegetales, en especial cuando se agregan cantidades relativamente altas de auxina. Los fisiólogos también han investigado la posibilidad de que las auxinas afecten el proceso usual de formación de raíces (Salisbury y Ross, 1992). Por lo tanto, son muchos factores los que pueden estar involucrados en la baja respuesta de enraizamiento obtenida en *Parkinsonia praecox*. Un factor principal que posiblemente influyó de manera sustancial en esta respuesta, es el periodo de exposición a la auxina, debido a que este se presentó hasta la quinta semana de cultivo, cuando la mayoría de los demás brotes habían decaído, por lo tanto, los brotes requieren de cierto tiempo de exposición a las auxinas para poder inducir la formación de meristemas radiculares.

En los tratamientos en que se utilizó AIA y no se obtuvo respuesta, fue quizás, debido a que las células cultivadas secretan numerosas enzimas, las cuales alteran la disponibilidad de los

nutrientes y otros elementos. Entre las enzimas que secretan se encuentra la AIA oxidasa, que es la enzima que degrada el AIA (Salisbury y Ross, 1992; Olvera, 2005), e interviene en el proceso de captación de la hormona y evita la formación de meristemos radiculares.

Un aditivo más, citado como promotor de enraizamiento es el carbón activado (debido a su capacidad de excluir la luz del medio). En *Acacia mearnsii* el porcentaje de enraizamiento fue alto en presencia de éste, incluso cuando la auxina no fue adicionada al medio de cultivo (Quoirin *et al.*, 2001). En medios donde el carbón fue utilizado para el enraizamiento de *P. praecox* no se produjo respuesta similar a lo antes reportado. En contraste, el carbón ayudo a evitar la clorosis en los tallos y la pérdida de folíolos de las hojas, en comparación con el tratamiento que se sometió a oscuridad. Ciertamente, las ventajas que provee el carbón activado dependiendo del tipo de cultivo son: la absorción de compuestos secretados por los tejidos cultivados o aquellos presentes en el agar que de otra manera inhibirían el crecimiento, la prevención de crecimiento de callo no deseado, la promoción de la morfogénesis, particularmente la embriogénesis y la porción en la formación de raíces (George, 1993; Quoirin *et al.*, 2001).

La utilización de las sales del medio MS en concentraciones de [1/2] y [1/4] libre de reguladores de crecimiento, con fines de enraizamiento, no presentó resultados similares a los reportados por Kaur *et al.*, (1998) para *Acacia catechu*. Se ha encontrado en la literatura modificaciones en la composición de los medios de enraizamiento, principalmente en los NO_3^- y NH_4^+ , que se sabe están involucrados con ciertos procesos de activación de meristemos radiculares. Por lo anterior, es necesario explorar diversas combinaciones de macro y micro elementos para poder lograr un método eficiente de enraizamiento en *Parkinsonia praecox*. El IBA al poseer una estructura distinta al AIA tiene la posibilidad de asimilarse de forma más lenta que otras auxinas, por lo que se recomienda explorar el uso de ella en diversas concentraciones, así como periodos de exposición más largos.

Finalmente, se recomienda para esta especie probar reguladores de crecimiento en distintas concentraciones a las utilizadas aquí, principalmente citocininas como BA o TDZ. Esta última es una citocinina recomendada debido a la alta frecuencia de brotes que produce por explante, sola y/o en combinación con otras hormonas (Tivarekar y Eapen, 2001).

Es necesario también determinar la relación entre los reguladores de crecimiento y la respuesta del tejido o explante utilizado, probando una serie de concentraciones de reguladores de manera que sea posible determinar con mayor precisión la relación dosis-respuesta.

Así mismo, el uso de diferentes explantes como cotiledones inmaduros, ya que se ha reportado que exhiben una alta formación de brotes (79 por explante) (Tivarekar y Eapen, 2001), embriones aislados, semillas inmaduras (Polanco y Ruiz, 1997), etc.

En cuanto a las plantas establecidas en invernadero es recomendable mantenerlas durante más tiempo en el cuarto de cultivo (quizás el doble de tiempo, es decir 4 semanas) antes de su transplante a condiciones externas, con el fin de incrementar el porcentaje de sobrevivencia.

Establecido el sistema de micropropagación para esta especie, es posible aplicarlo a producciones masivas de este árbol para su aprovechamiento. Las aplicaciones a las cuales puede ser sometida esta especie van en relación con su reintroducción al hábitat natural mediante la propagación por cultivo de tejidos; por ejemplo: para el cultivo del gusano comestible Cuchamá de manera local, en la producción industrial de goma, como planta ornamental de jardines de vegetación xerófila, como elemento en cultivos agrosilvopastoriles y muchas más. Por lo que es recomendable realizar pruebas de establecimiento ex vitro para diferentes tipos de manejo y aprovechamiento. El Valle de Zapotitlán Salinas, donde habita esta especie, ha mostrado paulatinamente diversos grados de perturbación como la disminución y pérdida de la diversidad biológica, erosión acelerada del terreno por actividades antropogénicas, crecimiento demográfico debido a la explotación de mantos freáticos (Olvera, 2005), etc. El potencial de uso de esta especie es clave para su conservación, por lo que consideramos a *Parkinsonia praecox* como una especie multipropósito del Valle de Zapotitlán Salinas.

CONCLUSIONES

Las plántulas y explantes de *Parkinsonia praecox* de dos y cuatro semanas de edad son un recurso potencial en la propagación *in vitro* de esta especie. Las regiones de las plántulas más prometedoras para realizar la propagación son: cotiledones, nudos cotiledonarios, hipocótilo, hojas y epicótilo, este último resulta más eficaz con yemas laterales en el explante.

El sistema semiabierto para el cultivo de callo y desarrollo de brotes es indispensable para mantener un intercambio gaseoso evitando la oxidación de compuestos fenólicos.

La combinación de citocinina-auxina en proporción de 2:1 adicionada a las sales del medio MS resultó ser el medio de inducción más efectivo en la organogénesis de brotes de *Parkinsonia praecox*.

Las respuestas organogénicas obtenidas en medio líquido para los explantes de ápice y raíz (recipientes con balsas o puente de papel) resultaron en la formación de brotes, por lo que esta especie es capaz de responder a diversos métodos de micropropagación.

Parkinsonia praecox ha sido una especie con dificultad para enraizar, por lo que es necesario establecer un método estandarizado probando diferentes concentraciones de la auxina AIB en periodos de cultivo con mayores periodos de exposición a los reguladores.

El propósito de este estudio fue el de explorar aspectos metodológicos de la propagación *in vitro* e iniciar sus aplicaciones en relación con reintroducción y aprovechamiento de *Parkinsonia praecox*.

REFERENCIAS

- Abundiz-Bonilla, L. A. M., Barajas Morales, J. Y Tenorio L. P. 2004. Anatomía de maderas de México: árboles y arbustos del matorral xerófilo de Tehuacán, Puebla. *Instituto de Biología*. UNAM.
- Ahee, J. y Duhoux, E. 1994. Root culturing of *Faidherbis = Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration, *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. **36**: 219-225.
- Alesso, S. P., Araujo, P. y Tapias, R. 2003. Aprovechamiento de la goma de brea (*Cercidium praecox*) en bosques secundarios del Parque Chaqueño Seco. Influencia del tamaño de las heridas sobre la producción. *Quebracho*. **10**: 60-70.
- Anderson, D. N. W: Weiping, W. y Lewis, G. P. 1990. The composition and properties of eight gum exudates (Leguminosae) of American origen. *Biochemistry Systematics and Ecology*, **18** (1): 39-42.
- Balarama, S. P. y Padmaja, V. 2003. Shoot organogénesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. **73**: 197-200.
- Barve, D. M. y Mehta, A. R. 1993. Clonal propagation of mature elite tress of *Commiphora wightii*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. **35**: 237-244.
- Blakesley, D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root initiation. En : Davis, T. D. y Haissig, B. E. Biology of adventitious root formation. *Plenum Press*. 343 p.
- Bon, M. C., Bonal, D., Goh, D. K. y Monteuis, O. 1998. Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* **53**: 171-177
- Burkart, A., y Carter, A. 1976. Notas en el género *Cercidium* (Caesalpinioideae) en Sud América. *Darwiniana* **20**(3-4): 305-311.

- Carter, A. 1974. The genus *Cercidium* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in the Sonoran desert of Mexico and the United States. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, **40**(2): 17-57.
- Chifa, C., Montenegro, S., Avallone, C. y Pire, S. 2000. Calidad polínica de las mieles producidas en el Depto. Güemes de la Prov. del Chaco (Argentina). *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- Choffe, K. L., Murch, S. J. y Saxena, P. K. 2000. Regeneration of *Echinacea purpurea* Induction of root organogénesis from hypocotyl and cotyledon explants. *Plant, Cell Tissue and Organ Culture*. **62**: 227-234.
- Clamens, C. G., León De Pinto, F., Rincón y Vera, A. 1998. Exudados gomosos de plantas localizadas en Maracaibo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* **103** (2):119-125.
- Dávila, P., Villaseñor, J. L., Medina, R., Ramírez, A., Salinas, A., Sánchez-Ken, J., y Tenorio, P. 1993. *Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Dhar, U. y Upreti, J. 1999. In vitro regeneration of a mature leguminous liana (*Bauhinia valii* Wight & Arnott) *Plant Cell Reports*. **18**: 664-669.
- Eapen, S., Tivarekar, S. y George, L. 1998. Thidiazuron induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. **53**: 217-220.
- Everitt, J. H. 1983. Seed germination characteristics of two woody legumes (Retama and Twisted Acacia) from South Texas. *Journal of Range Management*. **36** (4):411-414.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 2nd. Edition. *Exegetics Lmtd*. Great Britain. 574 p.
- Gharyal, P. K., Rashid, A. y Maheswari, S. C. 1993. Production of haploid plantlets in anther culture of *Albizzia lebeck* L. *Plant Cell Reports*. **2**: 308-309.

- Goyal, Y. y Arya, H. C. 1981. Differentiation in cultura of *Prosopis cineraria* Linn. *Current Science*. **50**: 468-469.
- Hawkins, J. A., White, L. O., Hughes, C. E., Contreras, J. L. y Mercado, P. R. 1999. Investigation and documentation of hibridization between *Parkinsonia aculeata* y *Cercidium praecox* (Leguminosae Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution*. **216** (1,2): 49-68.
- Hoque, Md. E. y Mansfield, J. W. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, **78**: 217-223.
- Huang, F. H., Alkhayri, J. M. y Gbur, E. 1994. Micropropagation of *Acacia mearnsii*, *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*. **30P**: 70-74.
- Indra, D. B. y Dhar, U. 2000. Combined effect of cytokinins on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bauhinia valii*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. **62**: 79-83
- Jain, R. K. 1997. Effect of some factors on plant regeneration from Indica rice cells and protoplasts – a review. *Ind. J. Exp. Biol.* **35**: 323-331.
- Jones C. y Smith D. 1988. Naphtalene acetic acid *in vitro* axillary bud of mature *Acacia melanoxylon*. *Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.* **38**: 389-393.
- Jordan, M., Larrain, M., Tapia, A. y Roveraro, C. 2001. *In vitro* regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* **66**: 89-95.
- Kaneda, Y., Tabei, Y., Nishimura, S., Harada, K., Akihama, T. y Kitamura, K. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr]. *Plant Cell Reports*. **17**:8-12.
- Kaur, K., Verma, B. y Kant, U. 1998. Plants obtained from the Khair tree (*Acacia catechu* Willd.) using mature nodal segments. *Plant Cell Reports*. **17**: 427-429.

- León De Pinto, G., Rodríguez, O., Martínez, M y Rivas, C. 1994. Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudate. *Carbohydrate Research*, **260**: 17-25.
- Lobo C. B. y Flores-Martínez A. 2001. Entre la depredación y el mutualismo: el caso de la interacción entre la leguminosa *Cercidium praecox* y el brúquido *Mimosetes amicus*. Presentación en cartel. *XV Congreso Mexicano de Botánica*. Sociedad Botánica de México
- López, R. R., Godínez, A. H. y Lira, S. R. 2004. Aspectos etnobotánicos y demográficos de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins, especie útil de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Laboratorio de Recursos Naturales y Ecología*. Simposio UBIPRO. UNAM FES-Iztacala.
- Losano M. A., Dottori, N. y Corsa, M. T. 2000. Secreciones intravasculares de sustancias gomosas en *Cercidium praecox* (Fabaceae). *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* **71** (1): 1-9.
- Mathur, I. y Chandra, M. 1983. Induced regeneration in stem explants of *Acacia nilotica*. *Current Science*. **52**: 882-883.
- Mittal, A., Agarwall. R. y Gupta, S. C. 1989 In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **9**: 65-70.
- Montaña C, Dirzo R y Flores, A. 1997. Structural Parasitism of an Epiphytic Bromeliad upon *Cercidium praecox* in an intertropical Semiarid Ecosystem. *Biotropica*, **29**(4): 517-521.
- Montaño, A. N. M. y Monroy, A. A. 2000. Conservación ecológica de suelos en zonas áridas y semiáridas en México. *Ciencia y Desarrollo*. SEP-CONACyT. Vol. XXVI **154**: 27-37.
- Monteuuis, O. y Bon, M-C. 2000. Influence of auxins and darkness on in vitro rooting of micropropagated shorts from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**: 173-177.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. **15**: 473-497.

- Nangia, S. y Singh, R. 1996. Micropropagation of *Acacia tortilis* Hayne (Umbrella thorn) through cotyledonary node culture, *Indian Journal of Experimental Physiology*. **1**(2): 77-79
- Olvera, H. M. 2005. Evaluación de los reguladores auxínicos AIA, AIB y p-nitrofenil-indo-3-acetato en la rizogénesis de *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Mimosa luisiana* de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Tesis de Licenciatura*. FES-Iztacala. UNAM
- Paredes, M. F., 2001. Contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. *Tesis de Licenciatura*. UNAM. FES Iztacala. 109 p.
- Pavón, N. P. y Briones, O. 2001. Phenological patterns of nine perennial plants in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *Journal of Arid Environments*. **49**: 265-277.
- Purohit, S. D., Kukda, G., Sharma, P. y Tak, K. 1994. In vitro propagation of an adult tree *Wrightia tomentosa* through enhanced axillary branching. *Plant Science*. **103**: 67-72.
- Polanco, M. C. y Ruiz, M. L. 1997. Effect of benzylaminopurine on in vitro and in vivo root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell Reports*. **17**: 22-26.
- Quoirin, M., da Silva, M. C., Martins, K. G. y de Oliveira, D. E. 2001. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **66**: 199-205.
- Ranga Rao, G. V. y Prasad, M. N. V. 1991. Plant regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*-multiple purpose tree legume. *Journal of Plant Physiology*. **137**:625-627
- Romano, A., Barros, S. y Martins-Loução, M. A. 2002. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **68**: 35-41.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 1999. Fisiología Vegetal. *Grupo Editorial Iberoamericana*. México D. F. 759 p.
- Singh, A. K., Chand, S., Pattnaik, S. y Chand, P. K. 2002. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber yielding tree legume. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* **68**: 2003-2009.

- Swamy, R. B., Himabindu, K. y Laxmi Sita, G. 1992. In vitro micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb) *Plant Cell Reports*. **11**: 126-131.
- Tivarekar, S. y Eapen, S. 2001. High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mungbean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **66**: 227-230.
- Vaquero, F., Robles, C. y Ruiz, M. L. 1993. A method for long-term micropropagation of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Reports*. **12**: 149-153.
- Vengadesan, G., Ganapathi, A., Prem. Anad., R. y Ramesh Anbazhagan, V. 2000. In vitro organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **61**: 23-28.
- Xie, D. Y. y Hong, Y. 2001. In vitro regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **66**: 167-173.
- Yang, J., Hu, Z., Guo, G. Q. y Zheng, G. C. 2001. In vitro plant regeneration from cotyledon explants of *Swainsona salsula* Taubert. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **66**: 35-39.

APÉNDICE

ABREVIATURAS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido a-naftalenacético
BA	6-benciladenina
CA	Carbón activado
KIN	Cinetina
MS	Medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog, 1962
SA	Hemisulfato de adenina
TDZ	Thidiazuron

La familia *Caesalpiniaceae*

La familia Leguminosae tradicionalmente ha sido dividida en tres grandes grupos en base a caracteres morfológicos, principalmente los florales. Las subfamilias más comúnmente reconocidas son *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae* (Leguminosae o Fabaceae) o menos frecuente como tres familias separadas, pero cercanamente relacionadas (*Caesalpiniaceae*, *Mimosaceae* y *Fabaceae*). La familia *Fabaceae* es por lo tanto, la más grande con 476 géneros y cerca de 14,000 especies, la *Mimosaceae* comprende 77 géneros y cerca de 3,000 especies y finalmente la familia *Caesalpiniaceae* con 162 géneros y aproximadamente 3,000 especies comúnmente de regiones tropicales. La familia *Caesalpiniaceae* tiene gran importancia en ecosistemas tropicales de Sudamérica y particularmente de África, esto se debe a su enorme diversidad de compuestos químicos y a sus diversas morfologías florales (Doyle, 2003).

Antecedentes Históricos en Parkinsonia praecox

A continuación se muestra una cronología de los estudios de morfología, taxonomía, ecología y biología de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins citado con su sinonimia *Cercidium praecox* (Ruiz & Pavón) Harms que han realizado diversos autores.

- Cozzo (1953) describió brevemente las punteaduras crateriformes en los elementos de vaso de la madera de *Cercidium*.
- Carter (1974) realizó una amplia descripción taxonómica del género *Cercidium* en el desierto Sonorense.
- Burkart y Carter, (1976) realizaron una descripción de las principales características fisonómicas del género *Cercidium*.
- León de Pinto et al., (1994) en un estudio químico y de espectroscopia, reportaron un heteroglicano, de núcleo estructural atípico para las gomas de *Cercidium praecox*.
- Clamens et al., (1998) observaron que 17 especies productoras de goma pertenecen, a las familias Mimosaceae y Caesalpiniaceae.
- Páez y Marco (2000) realizaron un estudio del hábitat de diversas especies de árboles y arbustos en Argentina, entre los cuales hacen referencia a *Cercidium praecox* como una planta nodriza muy importante para el establecimiento de otras especies.
- Montaña y Monroy (2000) proponen que el género *Cercidium* puede ser utilizado en un sistema agrosilvopastoril aplicable a agostaderos y parcelas agrícolas de zonas áridas y semiáridas, debido a sus características.
- Zavala-Hurtado et al., (2000) realizaron un estudio para determinar la influencia de la hormiga cortadora de hoja (*Atta mexicana*) en la estructura y patrones de dispersión de algunas especies de arbustos en una región desértica, entre ellas *C. praecox*.
- Losano et al., (2000) analizaron las secreciones intravasculares de la goma de *C. praecox*, determinando la causa de la secreción de la misma.
- Chifa et al., (2000) identifican a *Cercidium praecox* como una de las especies más visitadas por las abejas, ya que es de las especies que mayoritariamente se han observado granos de polen en las muestras de mieles analizadas en un estudio realizado en el Departamento Güemes de la Provincia del Chaco, Argentina.
- Pavón y Briones (2001) determinaron los patrones fenológicos de nueve especies de plantas perennes concluyendo que *C. praecox* tiene una forma de vida microfanerofita no suculenta y un sistema radicular profundo.

- Lobo y Flores-Martínez (2001) hicieron una descripción del proceso de infestación del brúquido *Mimosetes amicus* sobre la germinación de semillas de *Cercidium praecox*, concluyendo que este proceso beneficia en forma positiva el establecimiento de las plántulas.
- Fernández-Turiel et al., (2003) realizaron un estudio aplicando diversos métodos bioquímicos para la exploración de metales, determinando que las ramas de *Cercidium praecox* podrían ser útiles medios de muestreo, especialmente para contaminación ambiental asociada con arsénico (As), elemento que absorben a través del sistema radicular.

Cultivo de Tejidos Vegetales

Definición

El cultivo de tejidos es la ciencia que permite que células vegetales, tejidos u órganos aislados de una planta madre puedan desarrollarse en un medio nutritivo artificial. Esto incluye técnicas y métodos apropiados para la investigación dentro de muchas disciplinas de la Botánica y para diversos objetivos prácticos. Los nuevos brotes o plántulas producidos por cultivo de tejidos pueden ser reintroducidos al medio y continuar con su crecimiento, ser utilizados en investigación genética (George, 1993) o farmacéutica y, también estar disponibles como plantas para su comercialización.

Las principales ventajas de la micropropagación es que es más rápido multiplicar plantas y acelerar su desarrollo en especies donde es difícil o imposible por técnicas convencionales. El Cultivo de Tejidos tiene su fundamento en la teoría de la “totipotencialidad”, que establece que cada célula es autosuficiente y por lo tanto, capaz de regenerar una planta completa, si se le coloca en un ambiente propicio para ello.

Existen dos formas en las cuales el material vegetal puede hacerse crecer, ser propagado y manipulado in vitro, estas son el crecimiento organizado y el crecimiento indiferenciado.

b) Tipos de Cultivo de Tejidos

Cultivo de tejidos indiferenciados

“Cultivo de Tejidos” es comúnmente utilizado como un término colectivo que describe todos los tipos de cultivo de plantas in vitro, pero este término debería referirse estrictamente al cultivo de

agregados celulares dediferenciados. En la práctica los siguientes tipos de cultivos son los comúnmente conocidos:

- **Cultivos de callo o de tejido.** Es el crecimiento y mantenimiento de extensos agregados celulares los cuales surgen del crecimiento desorganizado y no coordinado de pequeños órganos vegetales, fragmentos de tejido vegetal, o células previamente cultivadas.
- **Cultivos de células en suspensión.** Son agregados de pequeños grupos celulares de plantas, dispersos en un medio líquido en constante agitación.
- **Cultivo de protoplastos.** Es el cultivo de células vegetales que han sido aisladas sin pared celular.
- **Cultivo de anteras.** Es el cultivo de anteras completas que contienen microsporas de polen inmaduras. El objetivo de es obtener plantas haploides mediante la formación de embriones somáticos directamente del polen, o algunas veces por organogénesis vía callo. Los cultivos de polen son aquellos iniciados de polen que ha sido removido de las anteras.

Cultivo de estructuras organizadas

El cultivo de órganos es usado como término general para aquellos tipos de cultivo en los cuales una forma organizada de crecimiento puede ser mantenido continuamente. Esto incluye el aislamiento aséptico de plantas completas con estructuras definidas como primordios foliares, flores y frutos inmaduros, y su crecimiento in vitro. Para propósitos de propagación vegetal, los tipos más comunes de cultivo de órganos son:

- *Cultivo de meristemas*, en los cuales se hace crecer brotes apicales de talla muy pequeña que consisten del domo meristemático apical con o sin primordios foliares. El cultivo del brote apical en la mayoría de los casos genera un sólo brote.
- *Cultivo de brotes*, se inician con los brotes o yemas apicales o axilares con varios primordios foliares, son de mayor talla que los brotes apicales empleados en el establecimiento de cultivos de meristemas. Estos brotes o yemas son comúnmente cultivados de cierta manera que cada uno produce múltiples brotes.
- *Cultivo de nodos*, cada uno consiste de pequeños fragmentos de tallo; los fragmentos de tallo pueden contener uno o múltiples nodos que pueden ser cultivados.

- *Cultivo de embriones*, es donde los embriones cigóticos fertilizados o no fertilizados son extraídos fuera de las semillas o frutos en desarrollo y son cultivados in vitro hasta que se desarrollan en plántulas. El cultivo de embriones es completamente distinto de la embriogénesis somática.
- *Cultivo de raíces aisladas*. Es el crecimiento de raíces separadas de los brotes o de la parte aérea de la planta: a partir de este cultivo se puede obtener un sistema radicular con muchas raíces laterales. Muy conveniente cuando las raíces producen algún metabolito secundario útil en la industria farmacéutica.