



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Propagación de “Zazafras” (*Prunus brachybotrya* Zucc)
utilizado en la medicina tradicional de El Veladero,
Acapulco de Juárez, Guerrero.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MONICA BIBIANA ROSAS LUNA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombres(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas

Año

1. Datos del alumno

Rosas
Luna
Monica Bibiana
58 62 64 04
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302274981

2. Datos del tutor

Dra.
Alicia Enriqueta
Brechú
Franco

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Guillermo
Laguna
Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Ángel
Villegas
Monter

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Armando
Gómez
Campos

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Ela
Alcántara
Flores

7. Datos del trabajo escrito

Propagación de "Zazafras" (*Prunus brachybotrya* Zucc) utilizado en la medicina tradicional de El Veladero, Acapulco de Juárez, Guerrero

78

2011

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco infinitamente a la Dra. Alicia Brechú por todo su apoyo, por confiar en mí y en este proyecto, por sus enseñanzas, palabras y sobre todo su amistad. Es una gran persona.

A mis sinodales por todos los comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la comunidad de El Veladero, por abrirnos sus puertas con la más grande confianza y amabilidad, para que este trabajo se pudiera realizar.

A la Universidad, que me ha dado tanto y me ha formado como persona que soy, a todos mis maestros que a lo largo de la carrera me enseñaron lo maravilloso de la Biología.

Un agradecimiento especial al Fis. Andrés Porta por cada una de sus valiosas palabras, tan acertadas y en el momento oportuno.

A mi familia. Mi abuela, Lucia por hacer crecer en mí la curiosidad sobre las plantas medicinales. Mis padres, Ana y Víctor por su apoyo incondicional en cada una de mis etapas, como estudiante y como hija. Mis hermanos, Kary, Maury y Anilu por su apoyo, risas y lágrimas que hemos compartido. Mi amigo y compañero, Samuel por habernos encontrado, por su compañía invaluable, por todas sus enseñanzas y por todos los logros que hemos vivido. Las palabras son pocas pero valiosas.

A mi amigo Beto, que es como de mi familia, por todas las aventuras que hemos vivido en cada una de las etapas de nuestra vida y por apoyarme en todos mis proyectos. Eres un gran amigo.

A mis amigos universitarios: Nayeli, Monse, Mariel, Lety, Iris, Itzue, Sandra, Jeaneth, Fabiola, Maira, Miguel, Luis, por su gran amistad y por todas las experiencias vividas durante la carrera.

Agradezco también a todas las personas que directa e indirectamente me han apoyado en todos los sentidos, a lo largo de toda mi vida estudiantil, ya que cada consejo me ha enriquecido como persona.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES	7
ANTECEDENTES	8
Generalidades de las semillas forestales	8
Fenología	9
Germinación	9
Latencia.....	10
Latencia innata o endógena	10
Latencia impuesta o exógena	11
Tratamientos para eliminar la latencia	11
Cultivo de tejidos vegetales	12
Familia Rosaceae.....	14
Características generales	14
Ubicación taxonómica.....	16
Descripción botánica específica.....	16
Investigaciones realizadas	18
MATERIAL Y MÉTODO	19
Información de herbario.....	19
Sitio y fecha de colecta.....	19
Sitio de trabajo	20
Material vegetal	20
Planeación de los experimentos.....	22
EXPERIMENTO 1: Prueba de viabilidad.....	24
EXPERIMENTO 2: Prueba de imbibición	25
EXPERIMENTO 3: Almacenamiento y germinación de frutos en suelo.....	27

EXPERIMENTO 4: Germinación <i>in vitro</i>	30
EXPERIMENTO 5: Almacenamiento y germinación de embriones <i>in vivo</i>	36
RESULTADOS	39
Información de herbario.....	39
Distribución de <i>Prunus brachybotrya</i>	39
Registros de <i>Prunus brachybotrya</i> con estructuras reproductivas colectados en el estado de Guerrero.....	40
EXPERIMENTO 1: Prueba de viabilidad.....	42
EXPERIMENTO 2: Prueba de imbibición	43
EXPERIMENTO 3: Almacenamiento y germinación de frutos en suelo.....	44
EXPERIMENTO 4: Germinación <i>in vitro</i>	46
EXPERIMENTO 5: Almacenamiento y germinación de embriones en sustrato.....	51
DISCUSIÓN	53
Información de herbario.....	53
Uso medicinal de la especie	55
Prueba de viabilidad.....	57
Prueba de imbibición.	61
Germinación <i>in vitro</i>	62
Almacenamiento y germinación <i>in vivo</i>	64
<i>In vitro</i> vs <i>In vivo</i>	67
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	71

RESUMEN

La riqueza biológica de México y su diversidad cultural, se han traducido en el desarrollo de una vasta tradición etnobotánica, la cual incluye el conocimiento, uso y manejo de especies vegetales a través de complejas formas de interacción, entre las comunidades locales y su entorno vegetal. Los habitantes, del estado de Guerrero poseen riqueza biológica y cultural, esto se observa en comunidades como El Veladero, donde se utiliza la corteza de Zazafras (*Prunus brachybotrya* Zucc), a la cual se le atribuyen propiedades medicinales para tratar padecimientos de la diabetes. Sin embargo, al descortezar los árboles, éstos quedan expuestos a organismos patógenos que les causan la muerte lo cual disminuye las poblaciones, por lo que el objetivo general de este trabajo fue conocer las condiciones necesarias para la propagación de *Prunus brachybotrya*. Se realizaron 5 experimentos para: pruebas de viabilidad, de imbibición, de almacenamiento y germinación de frutos *in vivo*, germinación *in vitro* y almacenamiento y germinación de embriones *in vivo*. Se encontró que las semillas colectadas directamente del árbol tienen mayor viabilidad que las semillas del suelo, la imbibición después de 2:30 h fue mínima, los mayores porcentajes de germinación se presentan al cultivar embriones tanto *in vitro* como *in vivo* en peat moss-agrolita, 1:1 v/v. El endocarpio limita la expansión de los cotiledones y provoca latencia mecánica. Las semillas de Zazafras se pudieron almacenar 38 días a temperatura ambiente y mantuvieron más del 95 % de viabilidad. Se concluye que la manera más eficaz de propagación es la siembra de embriones en suelo, la cual es una técnica fácil y económica que puede ser realizada por los habitantes de la comunidad, para la conservación de la especie.

INTRODUCCION

Durante muchos años las plantas medicinales fueron el principal y el único recurso del que disponían todas las culturas, para hacer frente a las enfermedades (Quesada., 2008). Actualmente la Organización Mundial de la Salud ha estimado que más del 80% de la población mundial, en países en desarrollo, depende para la salud de plantas medicinales (Canter *et al.*, 2005).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado la preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas con propiedades curativas. Actualmente, el deterioro del ambiente causado por la deforestación, uso indiscriminado de agroquímicos, contaminación del aire y del agua y otros factores, están agravando las condiciones ecológicas donde crecen miles de especies con potencial medicinal, muchas de estas especies desaparecen aún antes de haberlas identificado o haberlas estudiado (Quesada., 2008). A pesar de que la protección de algunas especies, puede lograrse a través de mayor regulación y recolección sustentable de plantas silvestres, otra alternativa a largo plazo, es promover el cultivo de plantas medicinales (Canter *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales, en el contexto tradicional, están ligadas a una concepción distinta del ser humano de la naturaleza; no es sólo que ellas sean menos tóxicas, más baratas, más fáciles de conseguir, o incluso sean más eficaces, también nos devuelven la mirada a la naturaleza, a la armonía del ser humano con su entorno y a una cultura donde lo vegetal, en términos de salud, también tiene algo que ofrecernos. Por otro

lado, la popularidad de las plantas medicinales va en aumento, hoy en día existe más gente que descubre en la fitoterapia una vía muy eficaz y barata de cuidar su salud (Quesada., 2008).

En México existen cerca de 30,000 especies de plantas vasculares (Rzedowski., 1978). La riqueza biológica de México, su diversidad cultural, así como su larga historia, se han traducido en el desarrollo de una vasta tradición etnobotánica, la cual incluye el conocimiento, uso y manejo de especies vegetales a través de complejas formas de interacción, entre las comunidades locales y su entorno vegetal. Las plantas de México son utilizadas para diversos propósitos, entre los que se incluyen usos medicinales, comestibles, colorantes, aromatizantes, maderables, combustibles, materias primas para artesanías, forrajes, adhesivos y otros usos diversos. Como puede observarse en cualquier inventario de plantas útiles, los usos más frecuentes de las plantas son alimentarios y medicinales (Caballero *et al.*, 1998).

Caballero *et al.* (1998), señalan que dentro de las familias botánicas con mayor número de especies utilizadas en México se encuentra Rosaceae con 59 especies. Asimismo, es una de las familias económicamente más importantes dentro de las plantas con flores, ya que muchas especies son cultivadas para producción de frutos o para uso ornamental. Sistemáticamente está dividida en cuatro subfamilias; Maloideae, Rosoideae, Spiraeoideae y Amygdaloideae (Prunoideae). Esta última incluye al género *Prunus* que contiene duraznos, ciruelas, cerezas y almendras (Morgan *et al.*, 1994).

En el estado de Guerrero se ha registrado hasta ahora una riqueza botánica, con 566 especies de plantas vasculares (Diego y Fonseca, 2004). En este estado se localiza el

ejido El Veladero, el cual forma parte de la costa chica del Municipio de Acapulco de Juárez, con altitudes que van de los 500-550 m, entre los paralelos 16°55' de latitud norte y 99°53' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich. El clima de esta región es cálido húmedo con temperaturas de 24.3-25.6 °C y la precipitación anual es de 1200-1400 mm (Hernández, 2007).

El Veladero, tuvo un papel trascendental en la época de la Independencia de México, siendo la fortaleza más importante para el ejército del General José María Morelos y Pavón. En consecuencia a su valor histórico y diversidad biológica, fue decretado como ANP con categoría de Parque Nacional, del cual el 78% del territorio es de propiedad ejidal y el resto forma parte del área protegida (Hernández, 2007).

El asentamiento de los habitantes en esta zona, ha permitido que se genere una estrecha relación de aprovechamiento y valoración de la naturaleza, incorporando a sus huertos plantas silvestres, lo que promueve la adquisición de conocimientos de la medicina tradicional. Sin embargo, Hernández (2007), concluye que dentro de la comunidad se observa una erosión cultural acerca del conocimiento tradicional de las plantas, por las nuevas generaciones, debido principalmente, a la carencia de recursos económicos para el campo y la poca productividad de éste, lo que ha obligado a algunos habitantes, salir en busca de trabajo a las grandes ciudades e incluso al extranjero.

Dentro del vasto número de plantas reportadas en esta región, encontramos a *Prunus brachybotrya*, *Prunus serótina* y *Prunus cortapico* (Diego y Fonseca, 2004). Estudios etnobotánicos, han revelado el uso tradicional de la primera especie, particularmente en comunidades rurales como el ejido el Veladero. El Zazafras (*Prunus brachybotrya*),

es un árbol al que se le atribuyen propiedades curativas contra la diabetes o azúcar en la sangre, que se detecta al aumentar las micciones, la sed y el hambre. Para controlar estos malestares los habitantes dejan reposar un trozo de corteza (del tamaño de la mano del enfermo) en agua durante una noche, que posteriormente tomaran como agua de tiempo (comunicación personal M. en C. Armando Gómez Campos).

La confianza generada en la gente a partir de los resultados obtenidos en el control de esta enfermedad, aunado a la baja representación de árboles de esta especie en la zona debido a la perturbación de su hábitat, ha generado que esta práctica cultural sea susceptible a desaparecer junto con la especie, afectando tanto al conocimiento tradicional que se puede heredar a las próximas generaciones, como disminuyendo un recurso importante para el tratamiento de sus enfermedades.

De acuerdo a Canter *et al.* (2005), aproximadamente dos tercios de las 50 000 especies de plantas medicinales utilizadas en el mundo son recolectadas de su hábitat natural y solo un bajo porcentaje es cultivado. Como resultado hay una creciente preocupación por la disminución de poblaciones naturales, pérdida de diversidad genética, extinciones locales y degradación del hábitat.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que en el mundo hay más de 220 millones de personas con diabetes, más del 80% de las muertes se registran en países en desarrollo y prevé que las muertes se multipliquen el doble para el 2030. En México la diabetes representa la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (OMS, 2011). En nuestro país, fallecen a causa de la diabetes 72 mil personas al año y se piensa que hacia el 2025 la enfermedad afectará a 11 millones de personas (Valadez, 2009).

Por lo anterior, es necesario acercarnos al conocimiento de las comunidades, para registrarlo y obtener información científica que permita sugerir estrategias para el manejo y aprovechamiento adecuado de los recursos y prevenir que desaparezcan.

El presente trabajo pretende contribuir en ese sentido a aportar conocimiento científico, al realizar ensayos experimentales en vías de conocer las condiciones físicas y ambientales que garanticen la propagación del Zazafras, con base en lo cual se pueda lograr el aprovechamiento sustentable de esta especie y disminuir el riesgo de perderla.

OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES

El objetivo general de este trabajo es conocer las condiciones controladas para la propagación de *Prunus brachybotrya*.

Objetivos particulares:

Identificar a la especie.

Registrar la fecha de floración y fructificación de *P. brachybotrya* en El Veladero.

Comparar la viabilidad de semillas colectadas del suelo con las colectadas directamente del árbol.

Registrar el efecto en la germinación de diferentes tiempos de imbibición en semillas colectadas del suelo y directamente del árbol.

Establecer las condiciones óptimas de germinación para la propagación de esta especie *in vivo* e *in vitro*.

Determinar el efecto del almacenamiento a temperatura ambiente en la germinación de semillas.

Evaluar el desarrollo de plántulas en invernadero.

Obtener la aclimatación de las plántulas fuera del invernadero para su reintroducción en la comunidad de origen.

ANTECEDENTES

Una de las estrategias, para reducir el deterioro ambiental, es la aplicación de métodos de conservación de la vegetación, mediante técnicas de propagación como la sexual, donde se promueve el desarrollo de plántulas a partir de semillas en tres etapas: 1)Activación, 2)Digestión y Translocación y 3)Crecimiento de la plántula. Para obtener resultados favorables se recomienda conocer los factores que podrían minimizar la germinación, como la calidad de la semilla, su letargo, factores ambientales y control de enfermedades; este conocimiento se obtiene al experimentar con pequeños ensayos (Hartmann y Kester, 1997).

El análisis de las estrategias de propagación de los árboles tropicales incluye aspectos fundamentales: las estrategias reproductivas donde se destacan los frutos, semillas, semillas/frutos, mecanismos de dispersión, latencia, viabilidad, germinación, tipos de emergencia y establecimiento. El estudio de las estrategias funcionales de cada especie es imprescindible para poder conocer la propagación natural de los árboles en el bosque y su adecuación a los planes de reforestación (Torres-Arias *et al.*, 2000).

Entre los patrones más notables, se encuentra el tipo de estrategia exuberante, que se caracteriza por la presencia de semillas grandes y pesadas, como las de *Prunus occidentalis* (Muñoz *et al.*, 2001).

Generalidades de las semillas forestales

La semilla es el principal órgano reproductivo de la mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación,

persistencia y dispersión de las plantas, en la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica (Martínez *et al.*, 2009).

Las reservas energéticas de las semillas son: grasas, carbohidratos y proteínas que sostendrán a la planta durante sus primeras etapas. El desarrollo de las plantas jóvenes es muchas veces difícil debido a la presencia de parásitos y depredadores específicos. Debido a lo anterior, la dispersión en áreas más amplias asegura que las semillas encuentren condiciones adecuadas para germinar y crecer. Sin embargo, en las comunidades naturales la mayoría perece por los efectos de un ambiente inadecuado para establecerse, por la competencia con otras plantas, depredación por animales y enfermedades (Martínez *et al.*, 2009).

Fenología

Las plantas presentan frecuencias de floración y subsecuente fructificación que van desde la producción continua de frutos a lo largo del año, a la producción sincrónica de frutos. El periodo de fructificación cambia entre localidades, incluso dentro de una misma región. Esta variabilidad se debe a variaciones en la disponibilidad de recursos para la reproducción o a los ciclos endógenos de la planta (Castillo *et al.*, 2001).

Germinación

La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas: 1) absorción de agua por imbibición y ruptura final de la testa; 2) inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las moléculas alimentarias en

las zonas de crecimiento del embrión, y 3) crecimiento y división celular, que provoca la emergencia de la radícula y la plúmula (Raven *et al.*, 1992).

Hay dos tipos de germinación, la epigea y la hipogea. En la primera, el hipocótilo se alarga y aleja a los cotiledones del suelo; en tanto que en la segunda el hipocótilo no se desarrolla y los cotiledones permanecen bajo el suelo o ligeramente sobre éste. La testa de la semilla puede permanecer cubriendo los cotiledones en el caso de la germinación hipogea, en tanto que en la epigea se desprende, lo cual permite la expansión de las hojas cotiledonarias (García *et al.*, 2006).

Latencia

Una vez que la semilla ha completado su desarrollo se inician los cambios que darán lugar al establecimiento del letargo en las semillas. Este letargo o reducción del metabolismo se denomina quiescencia cuando es causado fundamentalmente por falta de agua. Se denomina latencia cuando la semilla no germina a pesar de encontrarse en un lugar óptimo en cuanto a la temperatura y la humedad. Las variaciones micro y macroclimáticas, así como las condiciones hormonales y nutricionales de la planta progenitora tienen influencia en el establecimiento de la latencia de las semillas durante su desarrollo (Baskin and Baskin, 1998).

Latencia innata o endógena

Se presenta cuando el embrión cesa de crecer, cuando las semillas aún están en la planta madre. La presencia de inhibidores químicos de la germinación en el embrión o la inmadurez de éste, son probablemente las causas principales de esta latencia. En

algunas semillas tropicales se ha visto que sólo germinan mediante la aplicación de hormonas vegetales, como el ácido giberélico o almacenándolas en frío (Baskin and Baskin, 1998; Martínez *et al.*, 2009).

Latencia impuesta o exógena

Latencia por la cubierta de las semillas

Existen tres tipos: 1) latencia física, en la cual la testa o secciones endurecidas de otras cubiertas de la semilla son impermeables; 2) latencia mecánica, donde las cubiertas de las semillas son demasiado duras para permitir que el embrión se expanda durante la germinación, y 3) latencia química, corresponde a la producción y acumulación de sustancias químicas que inhiben la germinación (Herrera *et al.*, 2006)

Tratamientos para eliminar la latencia

Estratificación:

Consiste en colocar las semillas embebidas de agua, en capas húmedas de arena. El periodo de estratificación varia según la especie y puede ser fría a temperaturas de 0-10 °C o cálida a temperaturas altas de 22-30 °C (Willan, 2000).

Escarificación:

Es cualquier proceso de romper, rayar, alterar mecánicamente o ablandar las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases (Martínez *et al.*, 2009).

Imbibición:

Es otro de los tratamientos que permite eliminar la latencia, se utiliza con el fin de remover los inhibidores remojando las semillas en agua corriente o cambiándoles el agua con frecuencia (Bewley *et al.*, 1994).

Cultivo de tejidos vegetales

La biotecnología agrícola ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la producción agrícola. El cultivo de tejidos vegetales es una de ellas e incluye desde el cultivo de células aisladas hasta tejidos y órganos vegetales. Es un conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células bajo condiciones asépticas en un medio de composición químicamente definido y condiciones ambientales controladas. Uno de sus fines es, la producción de plantas madres y material de siembra libre de patógenos a partir del cultivo de meristemas. La base teórica para el cultivo de tejidos fue propuesta por Haberlandt en 1902 cuando estableció claramente el concepto de totipotencialidad. Todas estas metodologías han mostrado ser de gran utilidad en el desarrollo de estrategias para el aumento de la producción y productividad de los diferentes cultivos (Goldhaber, 2008; Romay *et al.*, 2006).

La aplicación del cultivo *in vitro*, hace posible la propagación rápida y masiva de plantas, ya que el cultivo en medios artificiales acelera significativamente el crecimiento, confiriendo así una ventaja más a esta herramienta (Malda *et al.*, 1999). También se ha encontrado que cada especie responde de manera diferente a las

condiciones y a los reguladores del crecimiento usados en el cultivo *in vitro*, por lo que es necesario encontrar el protocolo más adecuado y conocer su eficiencia de propagación (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

Otra aplicación del cultivo de tejidos, es el cultivo de embriones para rescatar el material que se utilizara en la propagación de frutales, cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad y ha servido para la obtención de híbridos en especies como peras y albaricoques, las cuales presentan aborto de embriones. Al rescatar los embriones se logra el mejoramiento genético de especies arbóreas ya que acorta el período siembra-floración; los embriones cultivados *in vitro* no necesitan un periodo de latencia anterior a la germinación. En algunas especies como *Iris* spp. (Iridaceae), al cultivar embriones se acorta el periodo de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe a algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endosperma y en la cubierta de la semilla. Por medio del cultivo de embriones *in vitro*, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el trasplante a las 2 ó 3 semanas (Roca y Mroginski, 1991).

Estudios de propagación *in vitro* en el género *Prunus* muestran la potencialidad de crecimiento para el desarrollo de brotes a partir de explantes de hoja, tallo y raíz (Sotiropoulos, 2006). Con lo anterior, podemos proponer que si las semillas de *Prunus brachybotrya* son sometidas a diferentes pruebas para conocer las condiciones óptimas de germinación tanto en suelo como *in vitro* entonces se podrá lograr la propagación de esta especie.

Dentro del cultivo de tejidos un factor esencial es el medio de cultivo. El medio modificado de Murashige *et al.* (1962) parece estar más cerca del medio ideal si se alteran las concentraciones de ciertos componentes. Por ejemplo, la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de embriones en forma de corazón es de 120 g/litro; existe en los embriones inmaduros en cultivo una tendencia a germinar precozmente, dando como resultado plántulas deformes con una probabilidad relativamente baja de sobrevivir, los niveles altos de sacarosa previenen la germinación precoz y proveen una fuente de carbohidratos mejor que otros azúcares (Roca y Mroginski, 1991).

Para embriones aislados de óvulos muy jóvenes se usan algunos medios relativamente complejos; los nutrimentos pueden incluir aminoácidos, vitaminas y varios extractos de plantas, además de los componentes orgánicos y minerales del medio (Roca y Mroginski, 1991).

Familia Rosaceae

Características generales

Rzedowski (2005), indica que esta familia contiene plantas herbáceas o leñosas, a veces provistas de espinas, en ocasiones trepadoras; hojas casi siempre alternas, simples o compuestas, estípulas por lo general presentes, a menudo deciduas o adnatas al peciolo; flores solitarias o dispuestas en inflorescencias variadas; flores usualmente actinomorfas y hermafroditas, pedicelo a menudo ensanchado en el ápice formando un hipantio, segmentos del cáliz (a veces acompañados de un verticilo exterior de bracteolas) y pétalos (3)5(10), estos últimos libres, de prefloración

imbricada, con frecuencia grandes y vistosos, raras veces desiguales, a menudo caedizos, en ocasiones ausentes; estambres de 1 a numerosos, por lo común 10 o más, libres o casi libres, dispuestos en verticilos, disco nectarífero por lo general presente; gineceo súpero o ínfero y en ese caso unido al hipantio, consistente de 1 a muchos carpelos libres dispuestos sobre un receptáculo, o unidos en un solo ovario de 2 a 5 lóculos, óvulos 1 a varios en cada carpelo, erectos o péndulos, estilos terminales, laterales o basales; frutos de formas variadas: folículo, pomo, aquenio, drupa, o bien, estos dos últimos coalescentes por muchos a manera de frutos agregados; semillas por lo común desprovistas o casi desprovistas de endospermo.

Las Rosaceae contienen varios géneros de taxonomía muy complicada y controvertida, por lo que el cálculo del número, sobre todo de las especies, es incierto. Se consideran unos 100 géneros con 2000 a 3000 especies representadas en todo el mundo, pero principalmente en regiones templadas y subtropicales del Hemisferio Norte.

La familia tiene gran importancia económica en virtud de los frutos comestibles de muchos de sus géneros, como es el caso de *Prunus armeniaca* L. (chabacano), *P. domestica* L. (ciruelo), *P. persica* (L.) Sieb. & Zucc. (durazno), *P. serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVaugh (capulín), *Crataegus mexicana* DC. (tejocote), *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa), *Pyrus communis* L. (peral), *P. malus* L. (manzano), *Rubus idaeus* L. (frambuesa); o bien, por ser arbustos o árboles ornamentales, como *Rosa* spp. (rosas) de hermosas flores, o *Pyracantha koidzumii* Rehd. (piracanto), frecuentemente utilizado como seto vivo en los jardines.

Ubicación taxonómica (Tropicos, 2010)

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Rosales Bercht. & J. Presl

Familia: Rosaceae Juss.

Género: *Prunus* L.

Especie: *Prunus brachybotrya* Zucc.

Descripción botánica específica.

De acuerdo a Rzedowski (2005) la descripción de *Prunus brachybotrya* Zucc, es la siguiente.

SINONIMIAS. *Prunus laurifolia* Schldl., *Prunus prionophylla* Standl.

NOMBRES COMUNES. Capulincillo, pixcle, zapotillo, duraznillo, venenillo, corta pico, naranjillo colorado, palo barranco, huevo de gato, aguacatillo.

FORMA. Árbol perennifolio hasta de 20-35 m de alto, glabro; ramillas grisáceas o las más jóvenes a menudo rojizas; estípulas lineares, de 6 a 9 mm de largo, a veces algo falcadas, pronto caedizas, peciolos de 8 a 22 mm de largo, por lo general gruesos y rígidos.

HOJAS. Láminas foliares elípticas, variando a ovadas, obovadas u oblongo-elípticas, de 6 a 18 cm de largo, de 2.5 a 8 cm de ancho, agudas o acuminadas en el ápice, cuneadas a redondeadas en la base, de margen entero, por lo común gruesas y de consistencia coriácea, verdes oscuras en el haz, más pálidas en el envés, costa prominente en el envés, donde a menudo se localizan dos glándulas oscuras, una a cada lado de la costa en la base de la lámina, sin embargo, tales glándulas pueden faltar o presentarse en cantidad diferente; racimos axilares, solitarios, hasta de 6 cm de largo, muy laxos a bastante densos, casi sésiles o con pedúnculos hasta de 2 cm de largo, brácteas ovadas, de 1 a 2 mm de largo, muy pronto caedizas, pedicelos de (0.5)2 a 9 mm de largo.

FLORES. Flores aromáticas; cáliz con el tubo acopado o turbinado, de 2 a 3.5 mm de largo y de ancho, glabro por dentro, sus lóbulos triangulares, de 0.3 a 0.5 mm de largo; pétalos blancos, suborbiculares, de 1.5 a 2 mm de diámetro, subunguiculados; estambres 20, anteras oblongas a casi circulares, de 0.6 a 1 mm de largo; estilo de 2 mm de largo, estigma disciforme.

FRUTO. Fruto globoso o algo oblato, de 1 a 1.6 cm de diámetro, negro en la madurez, hueso liso, de dimensiones un poco menores.

FLORACIÓN. Florece de octubre a abril; se han colectado frutos maduros en julio.

DISTRIBUCIÓN. Árbol relativamente frecuente y en ocasiones subdominante en el bosque mesófilo de montaña, también presente en algunos encinares y pinares húmedos. Se encuentra en altitudes de 800-2700 m.

Investigaciones realizadas

Pérez *et al.*, (1992) analizaron *in vitro* el contenido de cianuro de *Prunus brachybotrya* en hojas, tallo y fruto. Concluyendo que se considera más peligroso en los meses de abril a mayo, ya que durante este periodo la concentración de cianuro es mayor. Así, la intoxicación se intensifica más que en los otros meses, aunque está presente todo el año.

Pérez *et al.*, (2008) analizaron la anatomía de la madera de cinco especies de la familia Rosaceae, y mencionan que *P. brachybotrya* se encuentra en bosques templados de varios estados de la República Mexicana. Con base en las características de la madera, sugieren a esta especie como sustituto de *Cedrela odorata* (Cedro rojo, Meliaceae), principalmente por su veteado, textura e hilo.

Medina *et al.*, (2000) realizaron un estudio florístico en la comunidad indígena de nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán; y encontraron a *Prunus brachybotrya* como parte del bosque mesófilo de montaña a 2300 m de altitud.

En una búsqueda exhaustiva, no se encontraron antecedentes acerca de trabajos realizados sobre la propagación de esta especie.

MATERIAL Y MÉTODO

Información de herbario

Para conocer la distribución geográfica de *Prunus brachybotrya* Zucc, en México y en algunas localidades se revisaron ejemplares en el Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la UNAM y el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del IPN. Asimismo, se registraron las fechas de colectas previas de ejemplares de *Prunus brachybotrya* que contaran con estructuras reproductivas, principalmente frutos.

Sitio y fecha de colecta

El sitio de colecta fue el ejido El Veladero en el municipio de Acapulco de Juárez, Guerrero; perteneciente al Parque Nacional con el mismo nombre, el cual está ubicado en la región centro y Eje Neovolcánico (Figura 1).

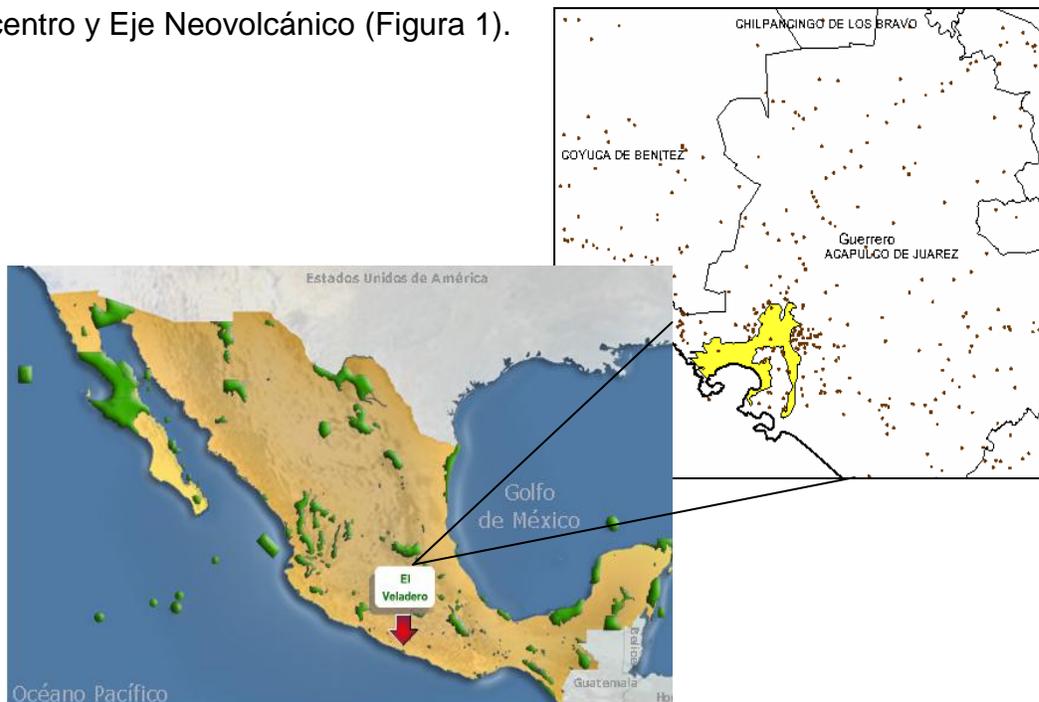


Figura 1. Ubicación geográfica del Parque Nacional el Veladero, en el Municipio de Acapulco de Juárez, Gro. Fuente: CONANP.

A partir de la información obtenida de la revisión de herbarios, se realizaron tres visitas a la comunidad, en los meses de Febrero, Abril y Mayo del 2008, monitoreando el desarrollo de los frutos.

Los frutos de Zazafras que se utilizaron en los experimentos se colectaron el 25 de Mayo del 2008, que fue cuando la semilla ya estaba formada, presentando los cotiledones y no solo tejido laxo como en los meses de febrero y abril.

La colecta se hizo de un sólo árbol ubicado a 800 m de altitud. Los pobladores comentaban que existían dos ejemplares más, sin embargo este fue el único que se pudo localizar.

Sitio de trabajo

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM y en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del programa de Fruticultura, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

Material vegetal

El ejemplar que se encontró en campo crecía sobre la orilla de un arroyo, era un ejemplar adulto que contaba con una altura de 30 metros y un diámetro a la altura del pecho de 95 cm. Los frutos colgantes más cercanos para la colecta se encontraban a una altura aproximada de 20 metros, por lo cual fue necesario subir por el tronco y cortar algunas ramas.

Durante las primeras visitas a la comunidad en los meses de febrero y abril, se intento colectar los frutos. Al cortar el fruto por la mitad se observó que la semilla aun no se

formaba, por lo que solo presentaba el endospermo. Por esta razón se hizo una tercera visita en mayo, encontrando las semillas formadas, con las siguientes características: tamaño promedio de 1.5 cm de longitud y 1.38 cm de ancho, epicarpio verde, mesocarpio escaso, endocarpio duro y color café. Cada fruto contenía una sola semilla dicotiledónea con tegumento. Se tomó en cuenta solo el tamaño para considerarlas maduras, por lo que se seleccionaron las más grandes (Figura 2).

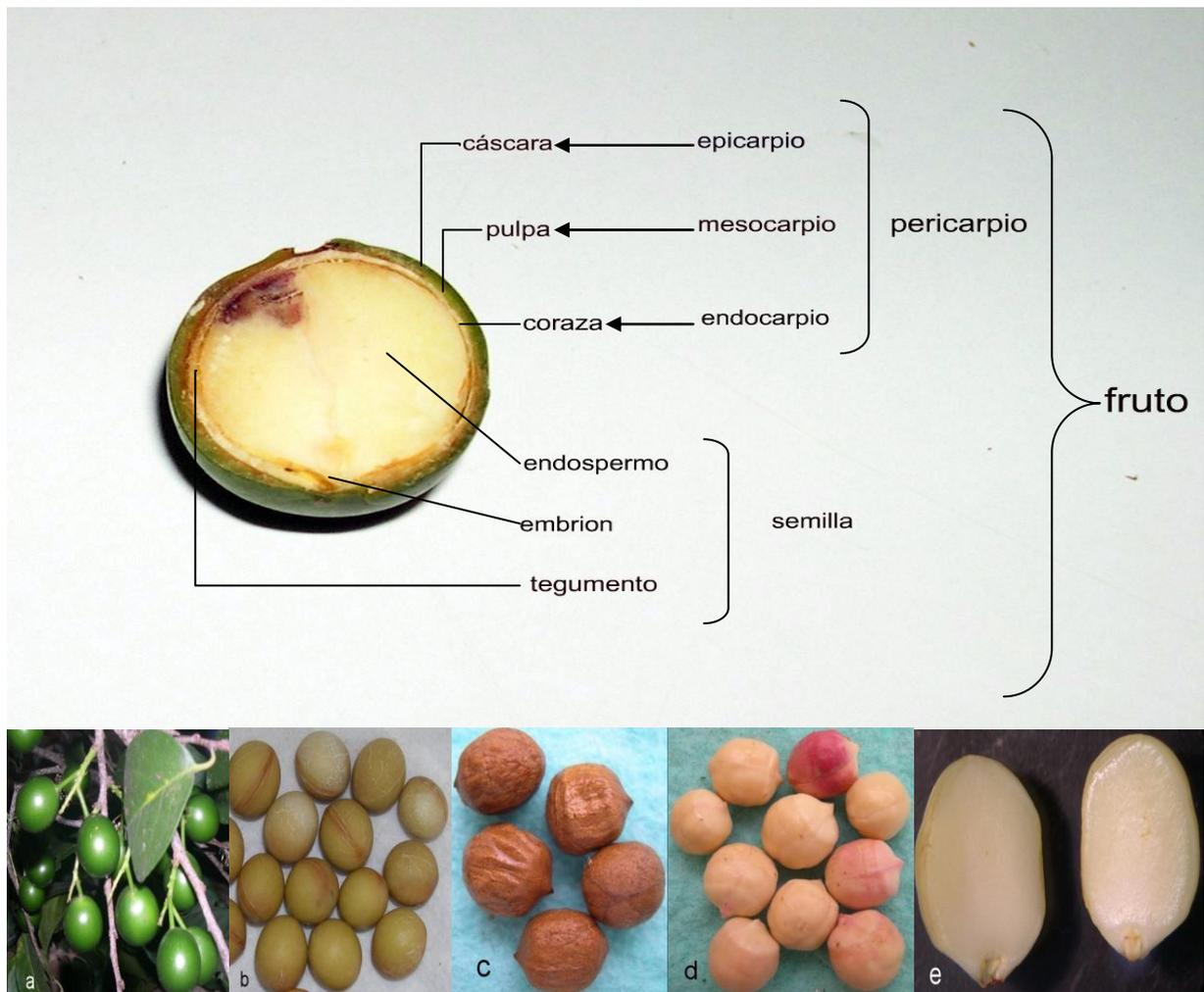


Figura 2. Esquema de fruto. Se señalan todas las estructuras que lo conforman. a) frutos completos, se observa el epicarpio, b) mesocarpio, c) semillas completas donde se observa el tegumento, d) semilla sin tegumento, con forma de garbanzo, e) cotiledones separados mostrando el endospermo y embrión.

Los frutos que se hallaron en el suelo, se encontraban a aproximadamente 3 metros de distancia del árbol sobre el caudal del arroyo. La mayoría de ellos ya estaban deshidratados adquiriendo un tono café oscuro y del mismo tamaño que los frutos colgantes. Estos mostraban una buena apariencia, sin embargo al cortarlos por la mitad se podía apreciar el tejido dañado desde los cotiledones hasta el embrión completo e incluso larvas en desarrollo (Figura 3).

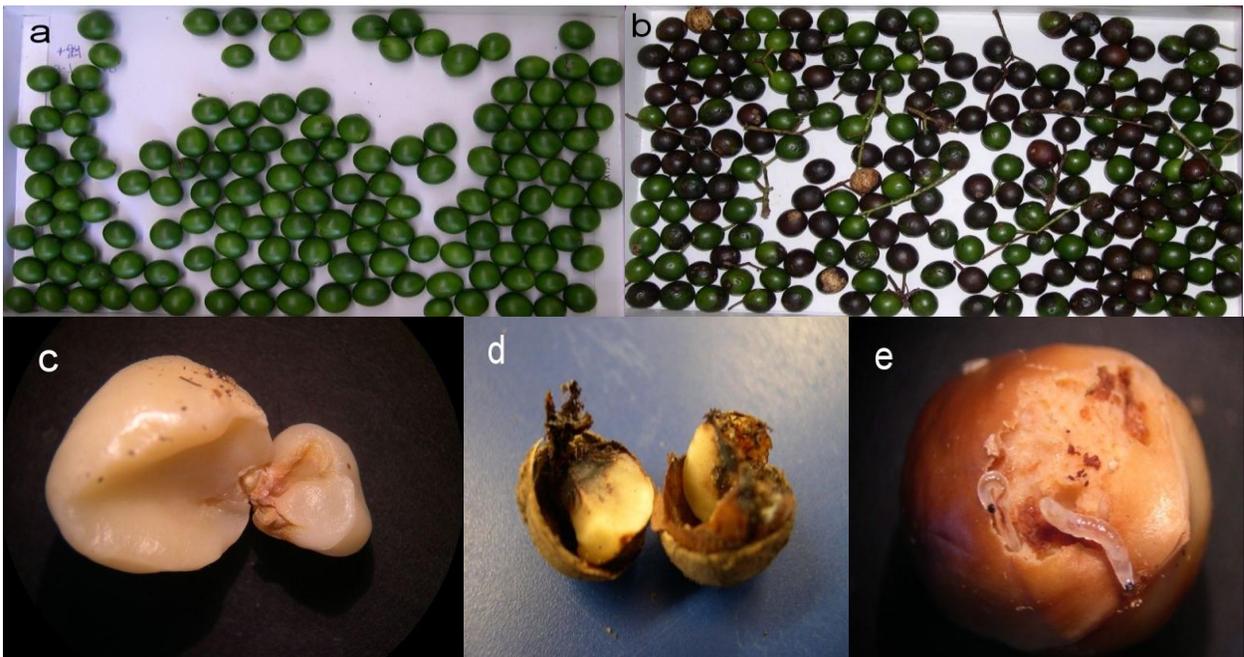


Figura 3. Frutos tomados del suelo. a) apariencia de frutos tomados directamente del árbol, b) apariencia que tenían los frutos tomados del suelo con respecto a los del árbol, c) embriones abortados, d) semilla con tejido dañado, e) semilla con larvas en desarrollo.

Planeación de los experimentos

Se realizaron en total 5 experimentos para poder determinar la respuesta germinativa de las semillas de zazafras. Estos consistieron en prueba de viabilidad, prueba de imbibición, almacenamiento y germinación de frutos *in vivo*, germinación *in vitro* y almacenamiento y germinación de embriones *in vivo* (peat moss-agrolita 1:1 v/v).

PLANEACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Colecta de frutos: 25 de Mayo del 2008

660 frutos

50 frutos del suelo 610 frutos del árbol

Experimento 1

Prueba de viabilidad.

-25 frutos de suelo.

-25 frutos de árbol.

Unidad experimental: grupo de 5 embriones.

-Registro de número de semillas viables.

Experimento 2

Prueba de imbibición.

Experimento factorial.

-25 frutos de suelo.

-25 frutos de árbol.

-tiempos de imbibición: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 minutos.

-Unidad experimental: grupo de 5 frutos.

-Registro de peso inicial y final.

Experimento 3

Almacenamiento y germinación de frutos en suelo.

Experimento factorial.

-200 frutos de árbol.

-Almacenamiento de 11 días, 20 días, 25 días, 32 días.

- Siembra semillas con endocarpio.

- Unidad experimental: maceta con 10 semillas con endocarpio.

- Registro acumulativo de la emergencia de plántulas.

Experimento 4

Germinación *in vitro*.

Experimento factorial.

-T°C de almacenamiento: 23°C y 4°C.

-Medio con carbón activado y sin carbón activado.

- 80 embriones

-80 semillas con endocarpio.

-Unidad experimental: tubo de ensaye con 1 semilla ó 1 embrión.

-Registro del crecimiento de la radícula y plúmula.

Experimento 5

Almacenamiento y germinación de embriones en suelo.

Experimento factorial.

-200 frutos de árbol.

-Almacenamiento de 38 días, 45 días, 52 días y 59 días.

- Siembra embriones.

- Unidad experimental: maceta con 10 embriones.

- Registro acumulativo de la emergencia de plántulas.

EXPERIMENTO 1: Prueba de viabilidad.

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con cinco repeticiones, de cinco embriones cada uno, de 25 semillas colectadas de suelo y 25 semillas de árbol.

Unidad experimental: grupo de 5 embriones.

VARIABLES EVALUADAS

Se cuantificaron como viables a las semillas cuyo embrión se tiñó de rojo.

CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

El día 3 de Junio de 2008, habiendo transcurrido 10 días desde la fecha de colecta, las semillas se partieron a la mitad con una navaja, evitando dañar el eje embrionario. En total se utilizaron 50 semillas de *P. brachybotrya* (25 de árbol y 25 de suelo), exponiendo el cotiledón y embrión a Tricloruro de tetrazolio (TTC) al 5%. Se mantuvieron sumergidos en cajas petri durante 12 hrs a temperatura ambiente. Se sacaron para ser observados en el microscopio estereoscópico y se registró la viabilidad como el número de embriones teñidos de rojo en cada repetición (Figura 4).

ANÁLISIS DE DATOS

Se determinó el porcentaje de viabilidad a partir de las semillas que presentaron el embrión teñido de rojo en cada repetición. Los resultados se expresaron gráficamente en porcentajes.

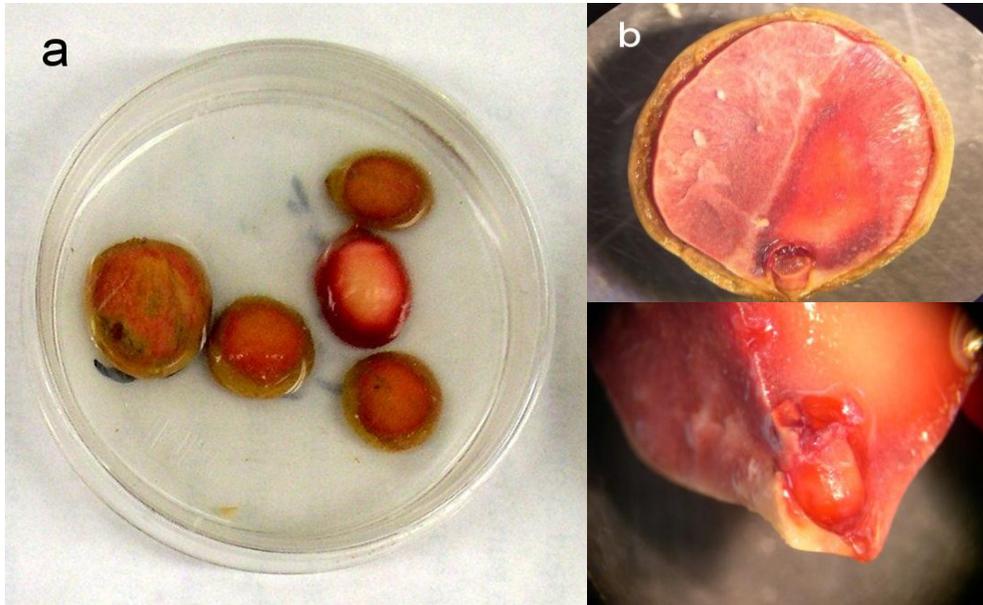


Figura 4. Prueba de viabilidad. a) caja petri con semillas cortadas por la mitad, exponiendo los embriones y cotiledón al TTC, b) embrión y cotiledón teñido de rojo, por lo que se considero como viable.

EXPERIMENTO 2: Prueba de imbibición

Diseño experimental

Experimento factorial. Se utilizaron semillas solo con el endocarpio. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones de cinco semillas del suelo, así como para las semillas de árbol. Los tratamientos empleados fueron 10 tiempos de imbibición.

Combinación de factores de variación y tratamiento. Unidades experimentales

Primer factor: Tiempo de imbibición para semillas, con 10 niveles: testigo o tiempo cero, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 minutos de imbibición.

Segundo factor: Procedencia de las semillas: con dos niveles del árbol y del suelo.

Se utilizaron 5 repeticiones de 5 semillas de árbol y de suelo para todos los tiempos de imbibición.

Semillas árbol: $5 \times 5 = 25$ semillas. Unidad experimental 5 semillas por recipiente.

Semillas suelo: $5 \times 5 = 25$ semillas. Unidad experimental 5 semillas por recipiente.

Variables evaluadas

Peso inicial y peso final de las semillas de suelo y de árbol, al término de cada tiempo: 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 y 150 minutos de imbibición.

Conducción del experimento

Las semillas se pelaron y lavaron con fibra para retirarles el exceso de epicarpio y mesocarpio. Se colocaron cinco lotes con cinco semillas provenientes de árbol, cada uno en vasos de precipitados marcados para su identificación. Se siguió el mismo procedimiento para los cinco lotes con cinco semillas provenientes de suelo.

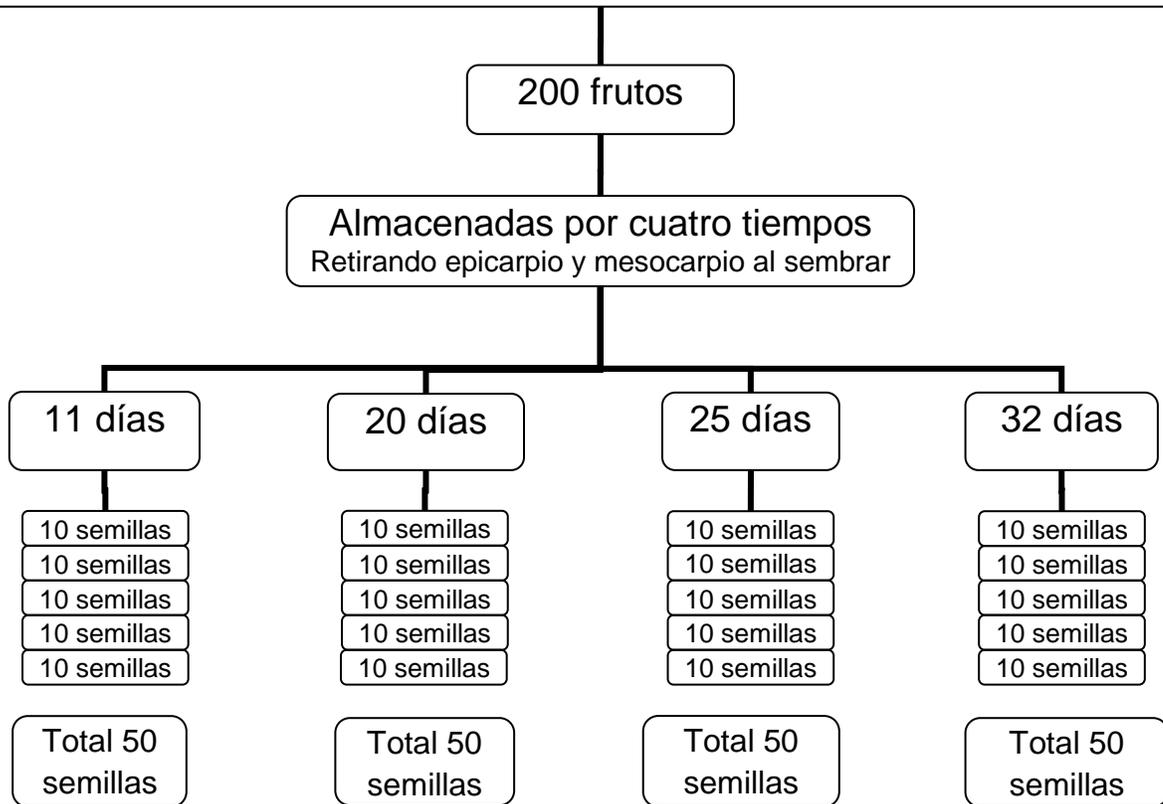
Se registró el peso inicial de cada lote, posteriormente se les agregó 100 ml de agua corriente y se dejó transcurrir el primer tiempo; se pesaron en una balanza analítica y se volvieron a sumergir en agua hasta completar el segundo tiempo y así sucesivamente hasta cubrir los 10 tiempos.

Análisis de datos

Para determinar la cantidad de agua que entró en la semilla se tomó el peso inicial y final de cada tiempo de imbibición. Se promediaron y compararon los pesos iniciales y finales para los lotes que contenían semillas de árbol con respecto a los lotes con semillas del suelo.

EXPERIMENTO 3: Almacenamiento y germinación de frutos en suelo

EXPERIMENTO 3: Almacenamiento y germinación de semillas en sustrato peat moss-agrolita 1:1 v/v.



Se planteó evaluar la respuesta de las semillas sembradas en suelo, tratando de semejar las condiciones en que se presentan naturalmente.

Además se pretendió conocer si la edad de los frutos influía en la germinación del zazafras en suelo, para lo cual se planteó hacer pruebas de germinación a diferentes tiempos de almacenamiento en el laboratorio después de la colecta, sembrando semillas con endocarpo.

Diseño experimental

De los 660 frutos obtenidos directamente del árbol en Mayo de 2008, 200 de ellos se almacenaron sobre una caja de cartón a temperatura de laboratorio (25°C) todos juntos y semanalmente durante cuatro semanas, se sembraron en suelo utilizando peat moss-agrolita 1:1 v/v en vasos de unicel de 1L, con el objetivo de registrar el porcentaje de germinación. Experimento factorial.

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 5 repeticiones de 10 frutos por tratamiento (50 frutos).

Combinación de factores de variación y tratamientos. Unidades experimentales

Primer factor almacenamiento. 4 tiempos: 11 días, 20 días, 25 días, 32 días.

Cada semana se sembraron 5 repeticiones de 10 semillas con endocarpo por maceta para cada tiempo de almacenamiento (11, 20, 25 y 32 de almacenamiento).

$4 \times 5 \times 10 = 200$ semillas. Unidad experimental. Maceta con 10 semillas con endocarpo.

Variables evaluadas

Registro acumulativo de la emergencia de plántulas cada semana.

Registro de la longitud de la plúmula y radícula a los 4 meses.

Conducción del experimento

Un total de 200 frutos colectados directamente del árbol, el día 25 de Mayo del 2008, se almacenaron al descubierto a la sombra sobre una caja de cartón a temperatura de laboratorio (25°C).

El día 4 de Junio del 2008, habiendo transcurrido 11 días desde la colecta, se tomó el primer lote de frutos de zazafras almacenados a temperatura de laboratorio y se formaron 5 grupos de 10 frutos cada uno. Se les retiro el epicarpio y el mesocarpio. Se sembraron 10 semillas con endocarpo por maceta en un sustrato peat moss-agrolita 1:1 v/v.

La segunda siembra, habiendo transcurrido 20 días de almacenamiento a partir de la colecta se tomó el segundo lote. Se repitió el mismo procedimiento para la tercera semana, habiendo transcurrido 25 días de almacenamiento y para la cuarta semana, habiendo transcurrido 32 días de almacenamiento. Todos los lotes consistieron de 5 grupos de 10 semillas por maceta y se sembraron en las mismas condiciones.

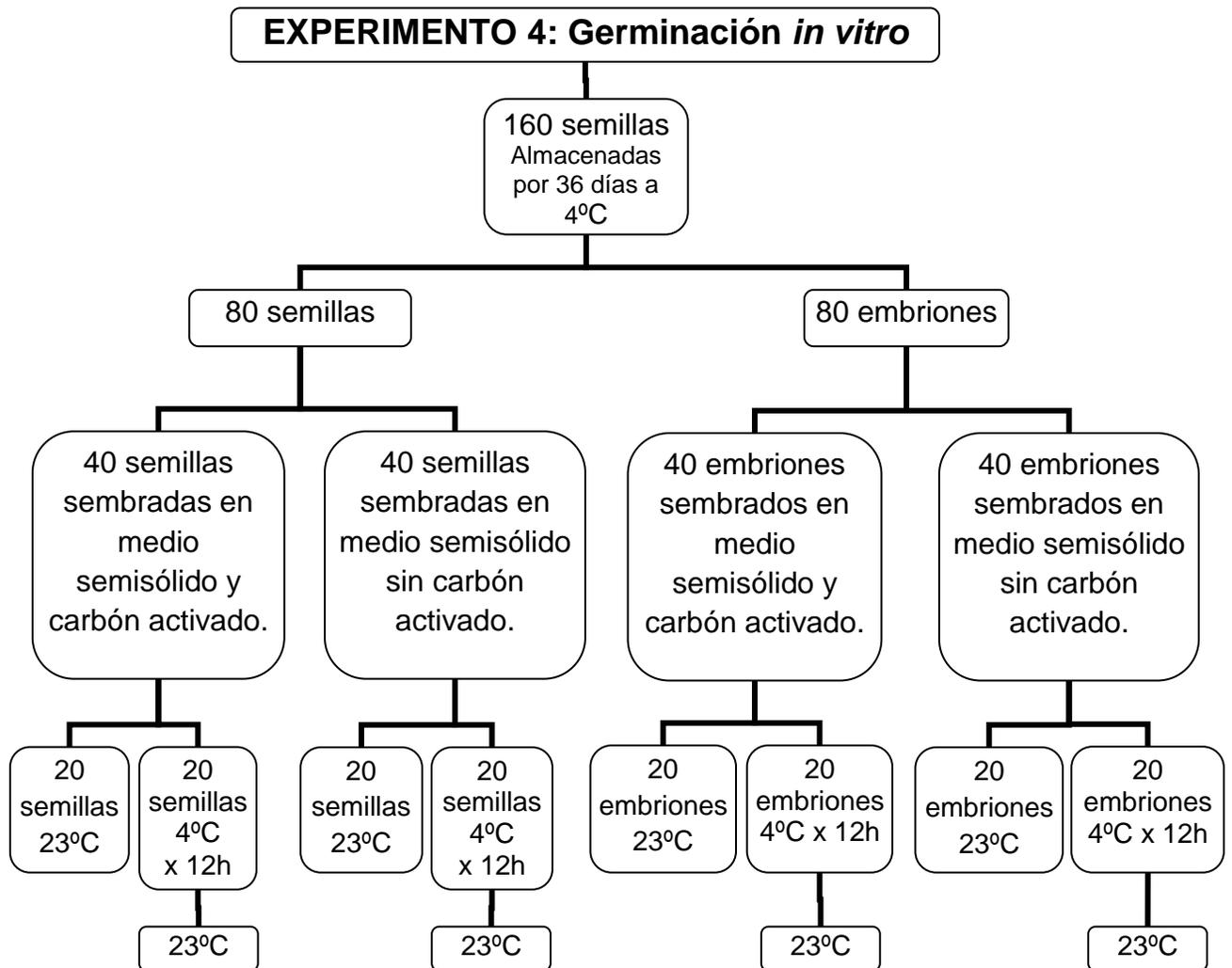
Las macetas se mantuvieron en el invernadero de la Facultad de Ciencias, siendo regadas cada tercer día con agua corriente y una vez al mes con solución de raízal en una concentración de 0.5 g / L.

Análisis de datos

Se consideraron germinadas las semillas cuando los cotiledones se exponían fuera del sustrato. Se registró el porcentaje de germinación de las semillas con endocarpo, con

respecto al tiempo de almacenamiento. Se aplicó una prueba de ANOVA para determinar si existían diferencias de acuerdo al tiempo de almacenamiento.

EXPERIMENTO 4: Germinación *in vitro*



Dado que los primeros frutos que se recolectaron directamente del árbol, estaban inmaduros (verdes) se eligió hacer la siembra en medios de cultivo que propiciaran su respuesta germinativa, por lo que se sometieron a un procedimiento de cultivo *in vitro*.

Diseño experimental

Germinación de semillas y embriones almacenados, a temperatura ambiente y refrigeración, en medio con y sin carbón activado en condiciones asépticas.

Experimento factorial.

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con 20 repeticiones de 1 semilla/embrión por tratamiento (80 semillas y 80 embriones).

Combinación de factores de variación y tratamientos. Unidades experimentales

Germinación de embriones aislados y de semillas con endocarpo, almacenados en frío y a temperatura ambiente, en dos medios de cultivo.

Primer factor. Pre-tratamiento de almacenamiento. 2 niveles: laboratorio (23°C) y refrigerado (4°C).

Segundo factor. Medios de cultivo. 2 niveles: con y sin carbón activado.

Tercer factor. Condición de las semillas. 2 niveles: embriones aislados y semillas con endocarpo.

Se utilizaron 20 repeticiones de 1 semilla con endocarpo o 1 embrión aislado, para cada uno de los tratamientos (laboratorio (23°C) y refrigerado (4°C), con y sin carbón activado).

$2 \times 2 \times 2 \times 20 = 160$ semillas y embriones. Unidad experimental: tubo de ensayo con 1 semilla ó 1 embrión.

Variables evaluadas

Emergencia de radícula y plúmula de las semillas/embriones, almacenados en frío y a temperatura ambiente en los medios de cultivo con y sin carbón activado.

Conducción del experimento

El 30 de junio de 2008, después de 36 días de refrigeración desde la colecta, 160 frutos de zazafras se sometieron a una evaluación de germinación en condiciones *in vitro*.

Se prepararon 160 tubos de ensayo con medio semisólido propuesto por Villegas *et al.* (1992) (Cuadro 1).

A 80 tubos se les agregó carbón activado y a los 80 restantes no se les agregó carbón activado

Desinfección y preparación del material biológico. A los 160 frutos se les eliminó el epicarpio y el mesocarpio con navaja quedando solo la semilla. Después las semillas se lavaron una sola vez con jabón de polvo y agua corriente, se dejaron escurrir en una coladera. Se desinfectaron durante 15 minutos en blanqueador comercial (Cloralex) al 30% v/v. Posteriormente en la campana de flujo laminar, se les retiró la solución de cloro por decantación y las semillas se secaron en sanitas previamente esterilizadas.

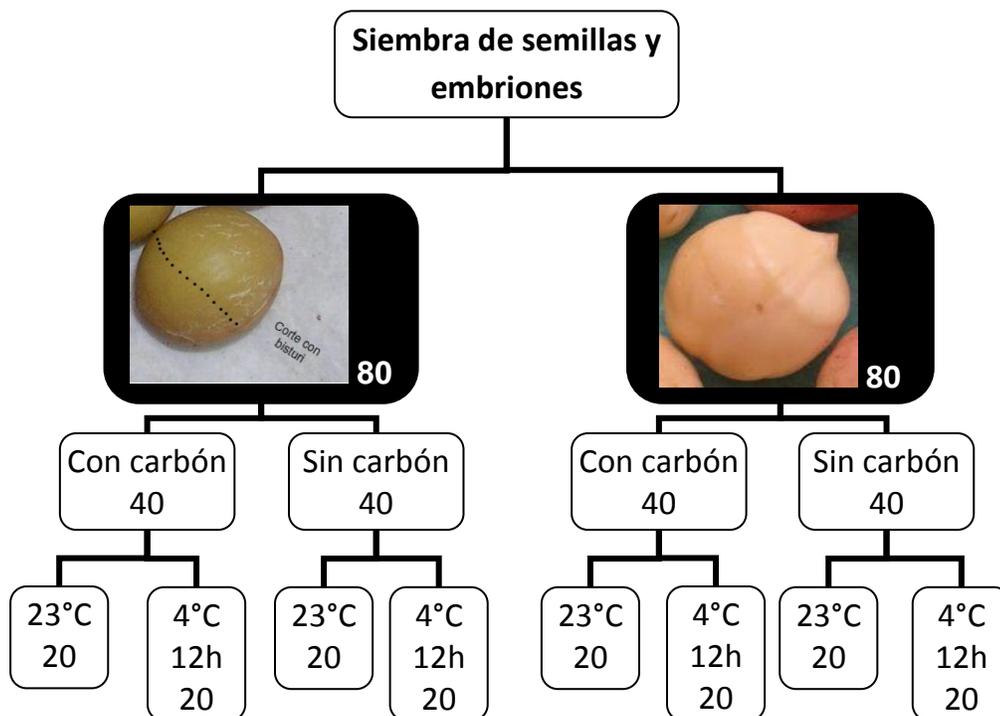
Para facilitar la entrada de agua y con base en la prueba de imbibición (experimento 2), se formaron dos grupos:

- uno con 80 semillas con endocarpio, a las que se le hizo una incisión superficial con bisturí previamente esterilizado, a la mitad del endocarpio, evitando lastimar los cotiledones y el eje embrionario (Figura 5).

- al segundo grupo de 80 semillas, se les hizo una disección para retirar el endocarpio y tegumento y de esta manera obtener el embrión.



Figura 5. Incisión superficial con bisturí previamente esterilizado, a la mitad del endocarpio.



Siembra de semillas y embriones.

Cada uno de los grupos de 80 semillas y 80 embriones se subdividieron en dos grupos, para sembrar 40 semillas/embriones en medio semisólido propuesto por Villegas *et al.* (1992) y adicionado con carbón activado y 40 semillas/embriones en medio semisólido propuesto por Villegas *et al.* (1992) y sin carbón activado. De esta manera se tenían 40 semillas en medio con carbón activado, 40 semillas en medio sin carbón activado, 40 embriones en medio con carbón activado y 40 embriones en medio sin carbón activado.

Pretratamiento de almacenamiento en diferente temperatura.

Se evaluó el efecto del almacenamiento de las semillas y embriones en dos condiciones de temperatura, previo a su exposición a condiciones de germinación.

De cada uno de los grupos con 40 explantes, se tomaron 20 tubos con carbón activado y 20 tubos sin carbón activado, para incubarlos directamente a 23°C en cuarto de cultivo. Los tubos restantes de cada uno de los grupos, 20 con carbón activado y 20 sin carbón activado, se sometieron a 4°C (refrigeración) durante 12 horas; transcurrido este tiempo se incubaron a 23°C en el cuarto de cultivo.

Análisis de datos

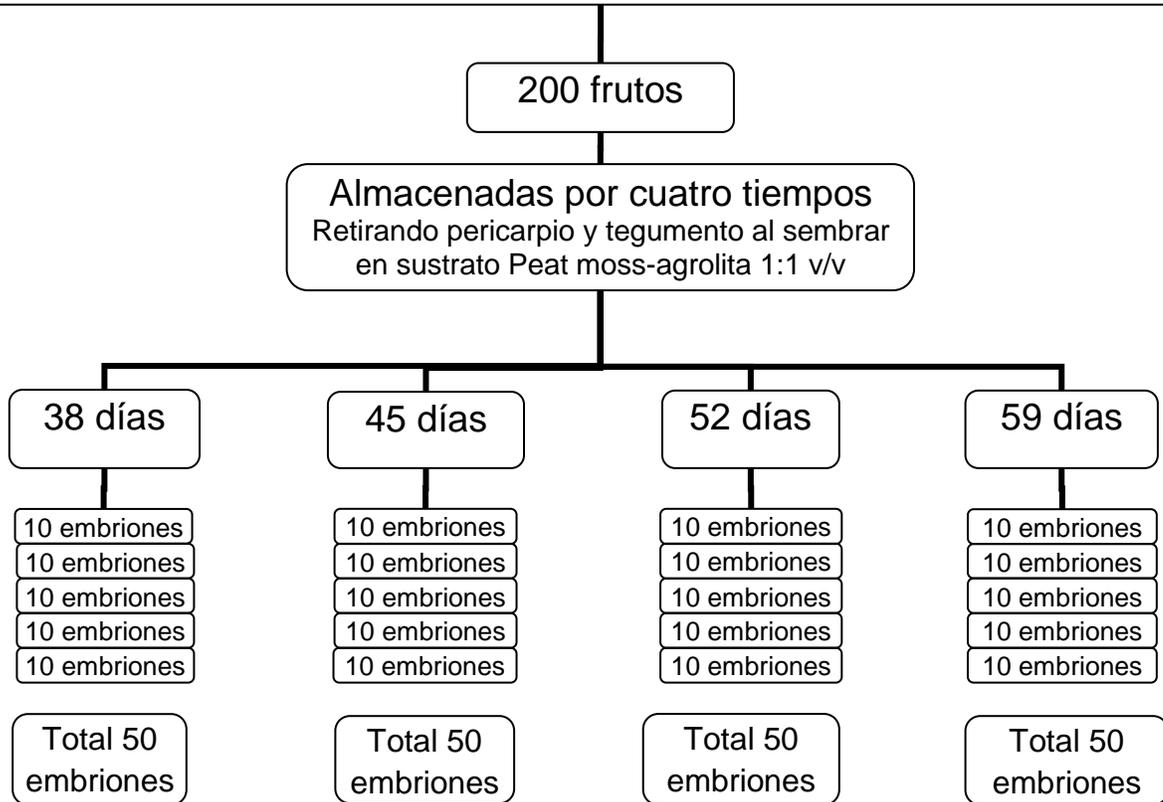
Se registró el avance de los cultivos, midiendo el crecimiento de la radícula y plúmula en la 2da, 3ra y 4ta semanas después de la siembra. Se realizó una prueba multivariada de ANOVA, para determinar si hubo diferencias en el desarrollo de la radícula y plúmula con respecto a los tratamientos y se aplicó la Prueba de Tukey con un $\alpha = 0.5\%$, para reconocer los tratamientos diferentes.

Cuadro 1. Medio de cultivo utilizado para la propagación *in vitro* de semillas y embriones de *Prunus brachybotrya*.

Medio semisólido propuesto por Villegas <i>et al.</i> (1992) Para 1 L.	
NH ₄ NO ₃	1mg
KNO ₃	0.79 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 mg
KH ₂ PO ₄	1.25 mg
Ca(NO ₃) ₄ ·H ₂ O	3 mg
Quelatos*	1 mg
Mioinositol	1 mg
Tiamina	1 mg
Micronutrientes**	1mg
AIB	0.03 mg
BA	0.3 mg
Sacarosa	300 mg
Agar	600 mg
pH	5.7
*Quelatos (mg/250 ml)	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	695
EDTA C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	931
**Micronutrientes (mg/250 ml)	
H ₃ BO ₃	155
MnSO ₄ ·H ₂ O	422.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	215
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.625
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.625

EXPERIMENTO 5: Almacenamiento y germinación de embriones *in vivo*

EXPERIMENTO 5: Almacenamiento y germinación de embriones *in vivo*



Se decidió determinar la respuesta germinativa *in vivo* utilizando sustrato peat moss-agrolita 1:1 v/v, de embriones extraídos de frutos almacenados en condiciones de laboratorio.

Diseño experimental

Se trabajó con 200 frutos verdes colectados directamente del árbol, que se mantuvieron almacenados sobre una caja de cartón en la sombra y a temperatura de laboratorio (25°C), de los cuales, cada semana se extrajeron lotes de embriones para su siembra. Se sembraron lotes de 10 embriones en sustrato peat moss-agrolita 1:1 v/v

con el fin de evaluar el porcentaje de germinación en relación al tiempo de almacenamiento. Experimento factorial.

El diseño experimental fue completamente al azar con 5 repeticiones de 10 frutos por tratamiento (50 frutos).

Combinación de factores de variación y tratamientos. Unidades experimentales

Germinación de embriones almacenados durante diferentes tiempos, a temperatura de laboratorio (25°C).

Primer factor almacenamiento. 4 tiempos: 38 días (5 semanas a partir de la colecta), 45 días (6 semanas), 52 días (7 semanas) y 59 días (8 semanas).

Se utilizaron 5 repeticiones de 10 embriones por maceta para cada nivel de almacenamiento.

$4 \times 5 \times 10 = 200$ frutos.

Variables evaluadas

Se registró la emergencia acumulativa de plántulas en cada lote con respecto al tiempo de almacenamiento.

Conducción del experimento

El día 01 de Julio de 2008, habiendo transcurrido 38 días de almacenamiento a partir de la fecha de colecta (5 semanas), se tomo el primer lote de 50 semillas, a las cuales se les retiraron todas las cubiertas, partiendo la semilla por la mitad para poder extraer

el embrión. Se formaron 5 grupos, de 10 embriones cada uno, que se sembraron en macetas con sustrato comercial de peat moss-agrolita 1:1.

A la siguiente semana, habiendo transcurrido 45 días de almacenamiento (6 semanas desde la colecta) se tomó el segundo lote de 50 semillas. Una semana después, con 52 días de almacenamiento (7 semanas) se tomó el tercer lote de 50 semillas. En la cuarta semana, con 59 días de almacenamiento, se tomó el cuarto lote de 50 semillas. Todos los lotes de embriones se sembraron en la misma mezcla comercial de peat moss-agrolita 1:1.

Las macetas permanecieron en condiciones de invernadero para monitorear la germinación. Se regaron con agua corriente cada tercer día y una vez al mes con solución de raizal (0.5 g /L).

Análisis de datos

Se registró el porcentaje de germinación de los embriones con respecto al tiempo. Se aplicó una prueba de ANOVA para determinar si existían diferencias de acuerdo al tiempo de almacenamiento.

RESULTADOS

Información de herbario

Se revisaron los ejemplares existentes de *Prunus brachybotrya* en el Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología de la UNAM y el Herbario ENCB del IPN. Se registró el número de ejemplares encontrados en cada herbario y no se tomaron en cuenta los ejemplares repetidos. Se hizo la distinción del número de registros que se hallaron sólo en el estado de Guerrero (Cuadro 2). Con estos resultados se tuvo una primera identificación de la especie que después fue corroborada por el M. en C Lucio Lozada Pérez del laboratorio de Taxonomía de Plantas Vasculares, además de obtener una distribución geográfica de la especie.

Cuadro 2. Registros de *Prunus brachybotrya*, en dos herbarios revisados.

	MEXU ¹	ENCB-IPN ²
Total	125	93
Registros en Guerrero	13	2

1. Herbario Nacional de México

2. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

Distribución de *Prunus brachybotrya*.

Se tomaron en cuenta las localidades señaladas en los ejemplares de herbario de *P. brachybotrya*, para ubicarlas en un mapa de la República Mexicana y así obtener la distribución de la especie en el país (Figura 6).



Figura 6. Mapa de distribución de *Prunus brachybotrya* en México obtenido a partir de los ejemplares revisados en los herbarios MEXU y ENCB-IPN.

Registros de *Prunus brachybotrya* con estructuras reproductivas colectados en el estado de Guerrero.

De la revisión de ambos herbarios se obtuvieron los datos de colectas hechas en el estado de Guerrero, sólo de ejemplares que contenían estructuras reproductivas, ya fuera flor o fruto. Estos datos correspondieron a la localidad, vegetación, fecha de colecta y altitud (Cuadro 3), y se utilizaron para monitorear las características ambientales y el tipo de vegetación donde se desarrolla la especie, para relacionarlo con la ubicación del El Veladero, y conocer el rango de fructificación para hacer las colectas de frutos. De acuerdo con los datos trabajados se seleccionó El Veladero,

porque de ahí surgió el conocimiento etnobotánico de la especie y por lo tanto la importancia de la aplicación de los resultados en este lugar.

Cuadro 3. Registro de ejemplares de herbario de *P. brachybotrya* con alguna estructura reproductiva, provenientes del estado de Guerrero, mostrando la localidad, vegetación, fecha de colecta y altitud.

	Localidad	Vegetación	Fecha de colecta	Altitud m
1	Omiltemi, Chilpancingo	Bosque Mesófilo	13 Marzo 1964	1 940
2	Atoyac de Álvarez	Bosque Mesófilo	19 Agosto 1985	1 100
3	2 Km al SW de Cruz de Ocote, Mpio. Chichihualco	Matorral Bajo	18 Octubre 1983	1 900
4	Atzala, 6.6 Km al SE de Chichila	Bosque de Galería	30 Mayo 1998	1 340
5	Municipio Atoyac, Localidad "El Ranchito"	Bosque Mesófilo	25 Mayo 1980	1 100
6	Campo Morado	Bosque Mesófilo	22 Mayo 1987	1 400
7	Las Anonas, Mpio. General Heliodoro Castillo	Bosque Tropical Caducifolio	19 Enero 1999	980
8	Municipios Iguala y Buenavista. Localidad Cañón de la Mano, entre "Los Amates" y "El Naranja"	Bosque Tropical Caducifolio	24 Enero 1987	900- 1000
9	Localidad Cruz de Ocote, camino Filo de Caballo-Puerto del Gallo. Mpio. Chichihualco	Matorral Bajo	18 Octubre 1983	----- -
10	Localidad Cruz de Ocote. Mpio Tlacotepec	Matorral Bajo	15 Diciembre 1985	----- -
11	Localidad Cañada Carrizalillo, 1 Km al SE de Amatitlan. Mpio. Eduardo Neri	Bosque de Quercus	25 Noviembre 1994	----- -
12	Chichihualco, rumbo al Naranja. Mpio. Leonardo Bravo	Bosque Tropical Caducifolio	6 Julio 1998	1000
13	Rincón Viejo	-----	1º Enero 1966	----- -
14	10 Km al SW de Carrizalillo, camino a Puerto de Gallo	Bosque Mesófilo	3 Junio 1983	2 600
15	6 Km al NE de Cruz de Ocote. Mpio. Chichihualco	Bosque de pino-encino	12 Marzo 1983	2 200

EXPERIMENTO 1: Prueba de viabilidad.

El porcentaje de viabilidad en semillas colectadas del suelo, obtenido con la prueba de Tricloruro de tetrazolio (TTC), con los 5 lotes de 5 semillas cada uno, fue de 4% en promedio; sólo el lote 4 mostró 20% de viabilidad con una semilla viable. Mientras que el porcentaje de viabilidad en semillas colectadas del árbol, fue de 84%. En este caso, el porcentaje de viabilidad por lote fue de 60% a 100% (Figura 7).

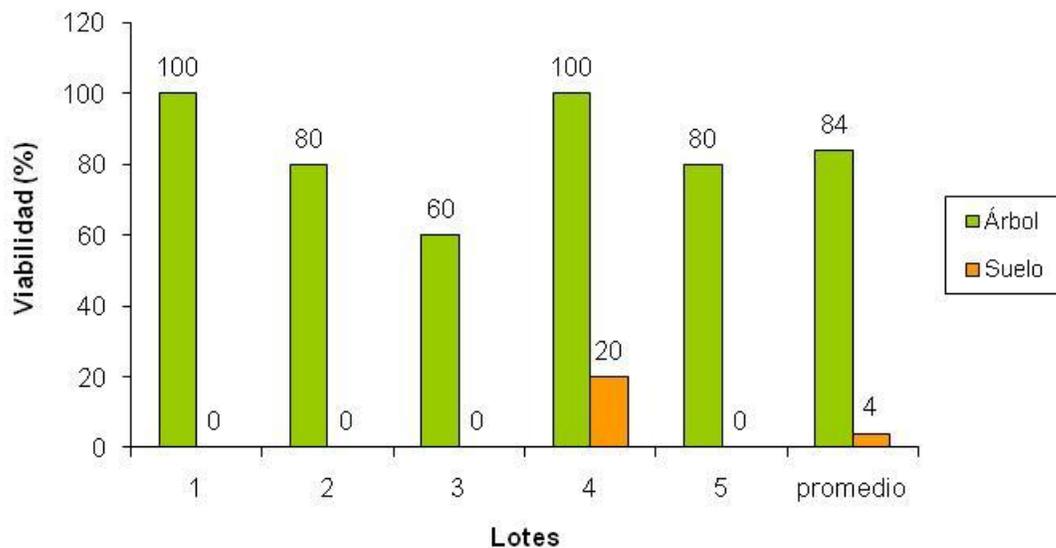


Figura 7. Porcentaje de viabilidad en embriones de frutos colectados del suelo y del árbol de *Prunus brachybotrya* Zucc. El Veladero, Acapulco, Gro.

El porcentaje de viabilidad en los embriones de frutos obtenidos de árbol fue mayor, en contraste con el mínimo de los embriones de frutos colectados del suelo debido a que la mayoría fueron inoculados por algún insecto (Figura 8).

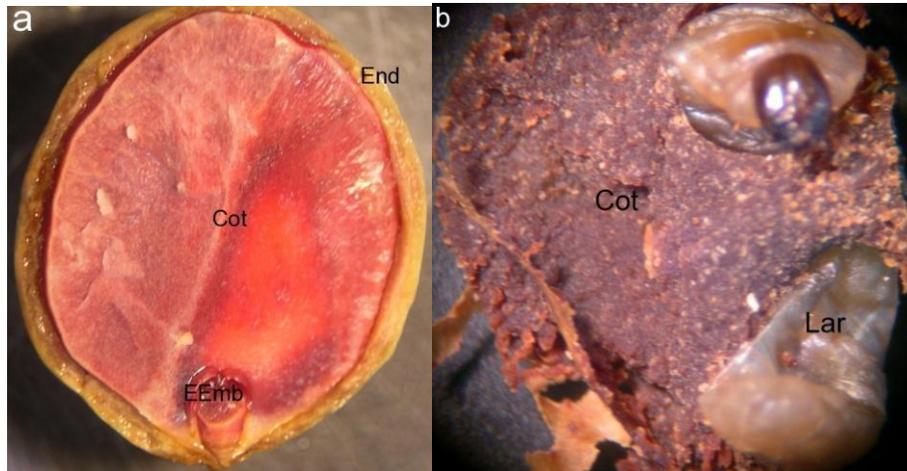


Figura 8. Viabilidad de las semillas de *Prunus brachybotrya* mediante la prueba de TTC. a) cotiledón y eje embrionario teñidos de una semilla colectada directamente del árbol. b) tejido muerto por crecimiento de larva, en una semilla colectada del suelo. (Cot-cotiledón, End-endocarpo, EEmb-eje embrionario y Lar-larva).

Con estos resultados se espera que la germinación promedio que se puede obtener con semillas colectadas del árbol sea de 84 %, con mínimo de 60 % y máximo de 100%, asumiendo que todas las semillas viables, germinen.

EXPERIMENTO 2: Prueba de imbibición

A lo largo de 150 min (2:30 h) la entrada de agua a través de la cubierta seminal fue mínima, tanto para las semillas colectadas del suelo como las del árbol. El promedio del peso inicial de los frutos provenientes del suelo fue de 5.44 g y los de árbol 6.03 g. El mayor incremento de peso en semillas de *Prunus brachybotrya*, de ambos orígenes se presentó en los primeros 10 minutos, a partir de esa evaluación hasta los 150 minutos, el incremento fue mínimo (Figura 9).

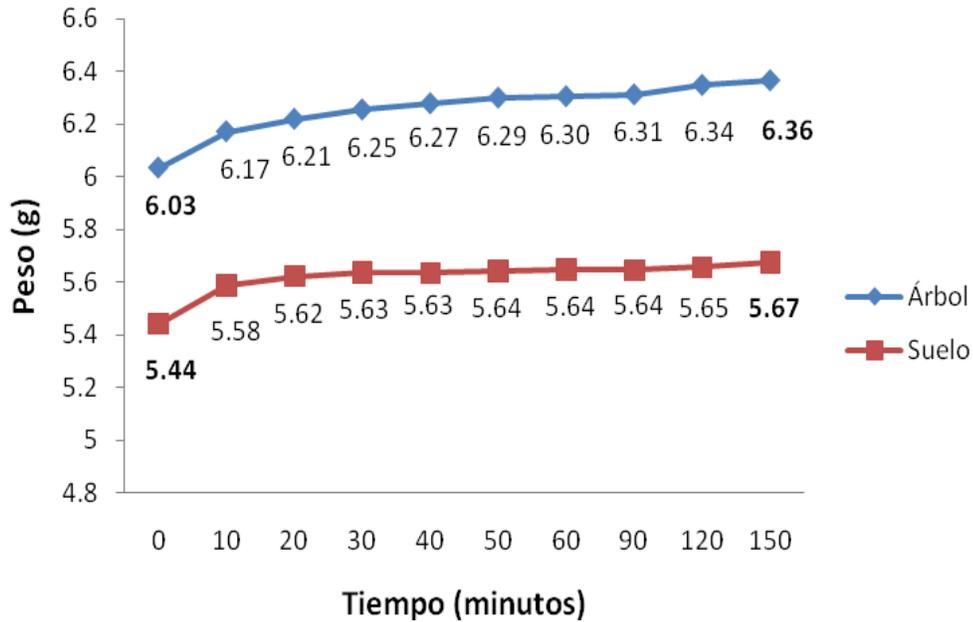


Figura 9. Dinámica de imbibición de semillas de *Prunus brachybotrya* Zucc, de dos orígenes: árbol o suelo. El Veladero, Acapulco, Gro.

EXPERIMENTO 3: Almacenamiento y germinación de frutos en suelo

Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento a temperatura del laboratorio, en la respuesta de semillas con endocarpo, sembradas en suelo en condiciones de invernadero, registrando el crecimiento de radícula y de plúmula.

El ANOVA mostró que existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las semillas con endocarpo almacenadas por cuatro periodos y sembradas en sustrato en condiciones de invernadero, ($F=8.33$, $P=0,0015$) (Figura 10). La germinación se evaluó a partir de la emergencia de plántulas.

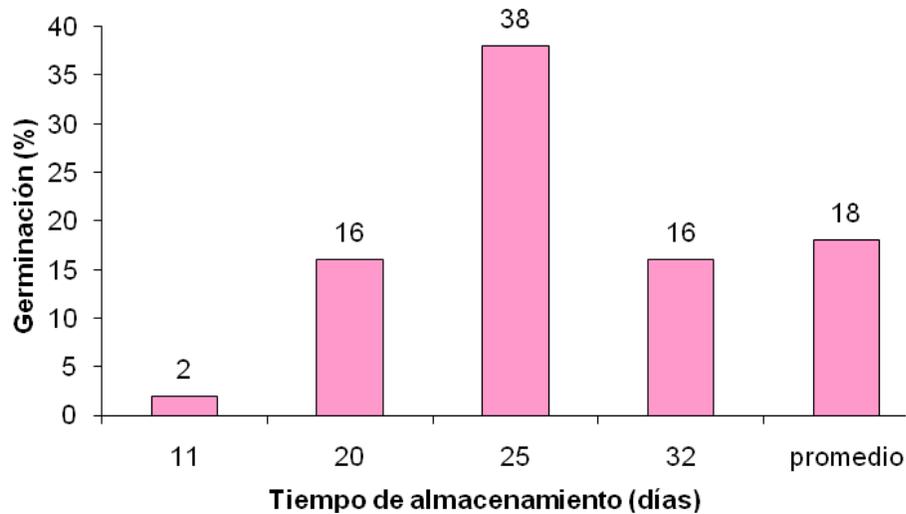


Figura 10. Porcentajes de germinación a diferentes tiempos de almacenamiento, de semillas con endocarpo de *Prunus brachybotrya* Zucc, sembradas en peat moss-agrolita 1:1 (v/v).

En cuanto al crecimiento de la radícula de las semillas con endocarpo, almacenadas durante cuatro periodos: 11, 20, 25 y 32 días, la prueba de ANOVA mostró que existen diferencias significativas, siendo mayor el crecimiento en aquellas con 25 días de almacenamiento ($F=2.912$, $P=0.035$).

Respecto a la longitud de la plúmula de las semillas con endocarpo, registrada a los 4 meses de crecimiento (cuando se hizo el transplante); el ANOVA mostró que no existen diferencias significativas en el crecimiento de ésta ($F=0.572$, $P=0.634$) (Figura 11).

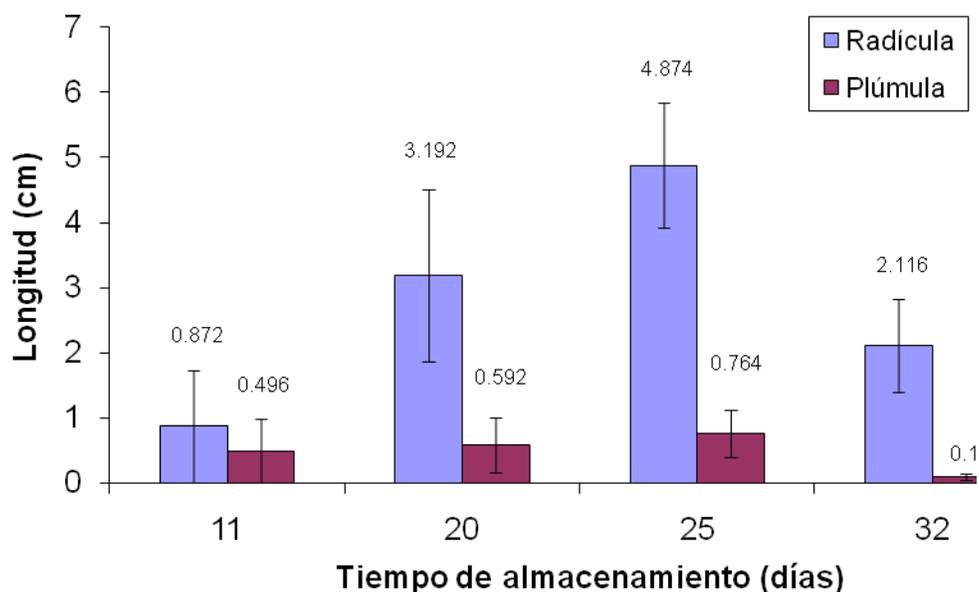


Figura 11. Crecimiento de radícula y plúmula en semillas con endocarpio de *Prunus brachybotrya* Zucc almacenadas durante 4 periodos y sembradas en peat moss-agrolita 1:1 v/v.

EXPERIMENTO 4: Germinación *in vitro*

Germinación

Los porcentajes de germinación en la cuarta semana mostraron que de las 80 semillas con endocarpo sembrados *in vitro*, sólo el 27.5 % germinaron y de los 80 embriones extraídos el 98.75 % germinaron (Figura 12).

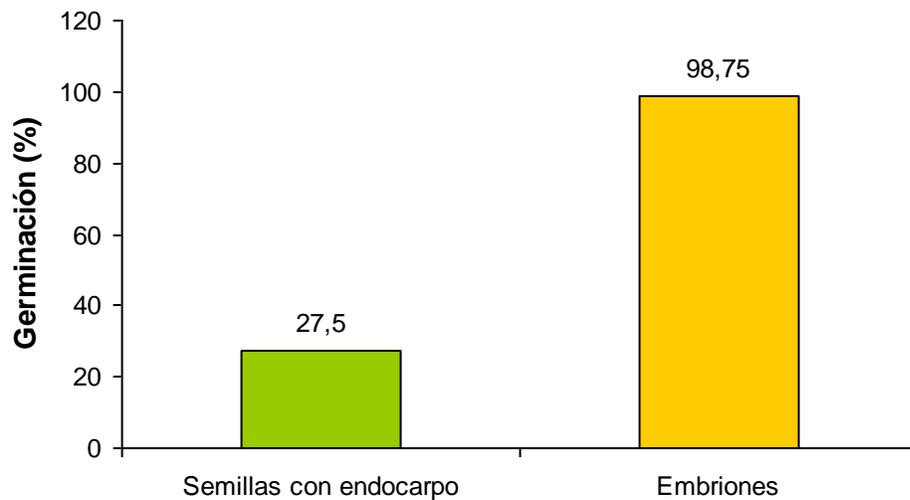


Figura 12. Porcentajes de germinación *in vitro* en la cuarta semana, de semillas con endocarpo y embriones extraídos de *Prunus brachybotrya* Zucc.

Desarrollo de la radícula.

El ANOVA mostró que existen diferencias significativas en el crecimiento de la radícula, al considerar sólo los efectos del tiempo ($F= 74.241$, $P= 0.0001$) y la condición de la semilla, con endocarpo ó embriones ($F= 446.590$, $P= 0.0001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas respecto al almacenamiento a temperatura de laboratorio y refrigeración ($F= 2,1139$, $P= 0.146$), tampoco con el medio de cultivo, con y sin carbón activado ($F= 0.8176$, $P= 0.3663$) (Figura 13).

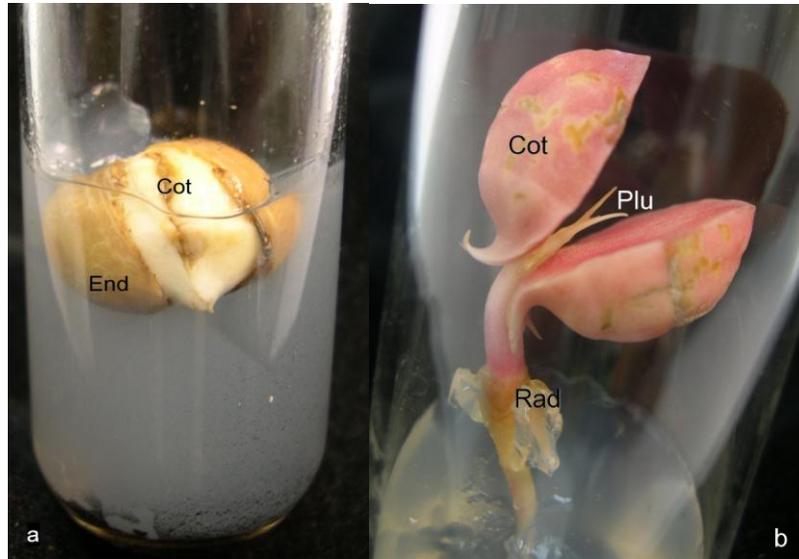


Figura 13. Germinación *in vitro* de semillas con endocarpo (a) y embriones (b) de *Prunus brachybotrya* Zucc, dos semanas después del establecimiento. (Cot-cotiledón, End-endocarpo, Plu-plúmula y Rad-radícula).

Los niveles que resultaron diferentes para el crecimiento de la radícula, fueron: el periodo 3 y 4 semanas con valores superiores respecto a la semana 2; y con el factor condición de la semilla, fueron superiores los embriones aislados (Figura 14 y 15).

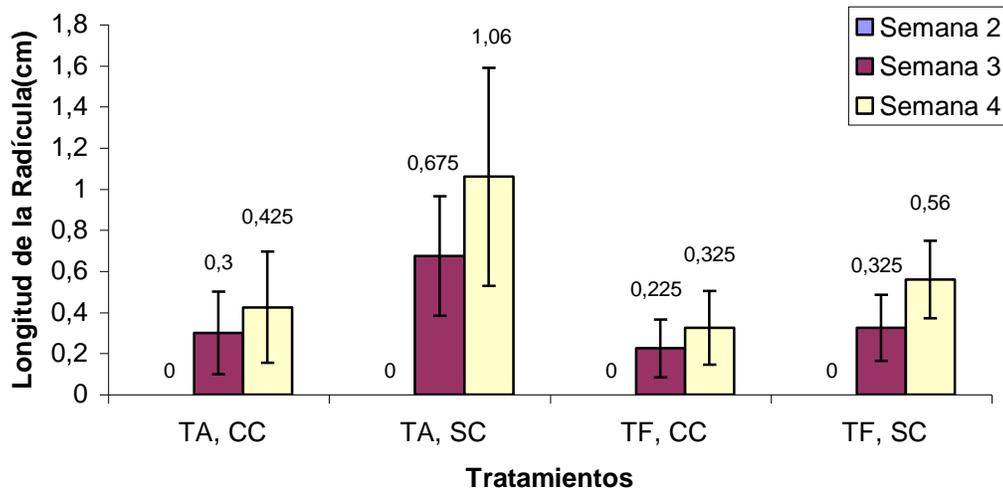


Figura 14. Longitud de la radícula en semillas con endocarpo desarrolladas *in vitro*, evaluado a las 2, 3 y 4 semanas a partir de la siembra. Tratamientos: TA-Temperatura de laboratorio (23°C), TF-Refrigeración (4°C), CC-Medio Con Carbón Activado, SC-Medio Sin Carbón Activado.

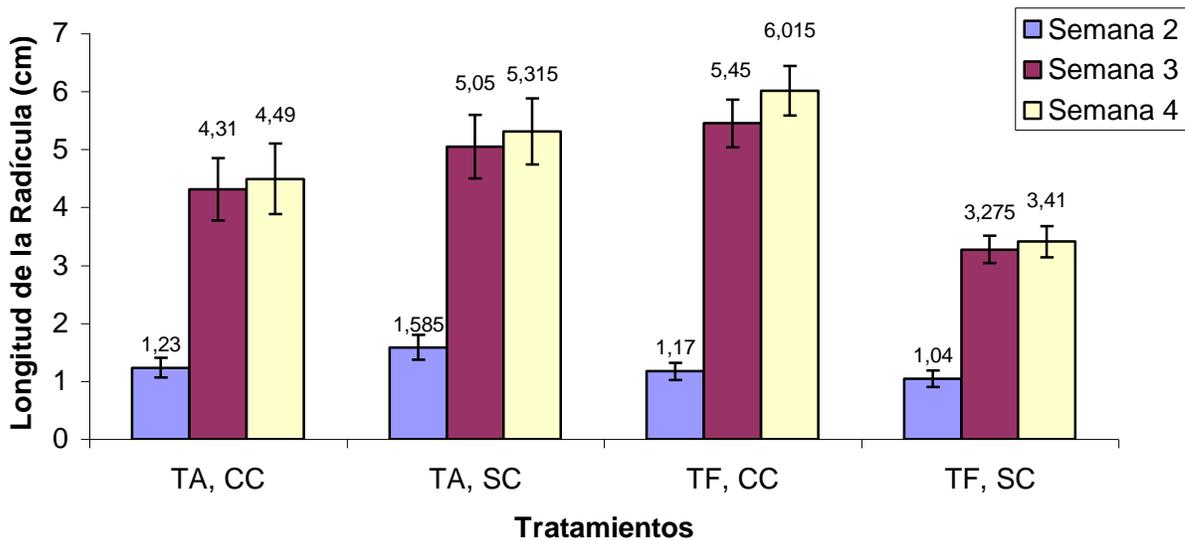


Figura 15. Longitud de la radícula en embriones extraídos de *Prunus brachybotrya* Zucc *in vitro*, evaluado a las 2, 3 y 4 semanas a partir de la siembra. Tratamientos: TA-Temperatura de laboratorio (23°C), TF-Refrigeración (4°C), CC-Medio Con Carbón Activado, SC-Medio Sin Carbón Activado.

Desarrollo de la plúmula.

En el crecimiento de la plúmula, el ANOVA mostró que existen diferencias significativas al considerar sólo los efectos del periodo ($F= 32,846$, $P= 0.0001$) y la condición de la semilla ($F= 102,9081$, $P= 0.0001$). No hubo diferencias significativas respecto al factor almacenamiento en laboratorio y refrigeración ($F= 0,3687$, $P= 0,5440$) tampoco con el tipo de medio de cultivo con y sin carbón activado ($F= 1,3846$, $P= 0,23990$).

Los niveles del periodo que resultaron diferentes para el crecimiento de la plúmula, fueron: la semana 4 con valores superiores respecto a las semanas 2 y 3, así como también la semana 3 superior a la semana 2. Y el factor condición de la semilla, siendo superiores los resultados en el tratamiento con embriones aislados (Figura 16 y 17).

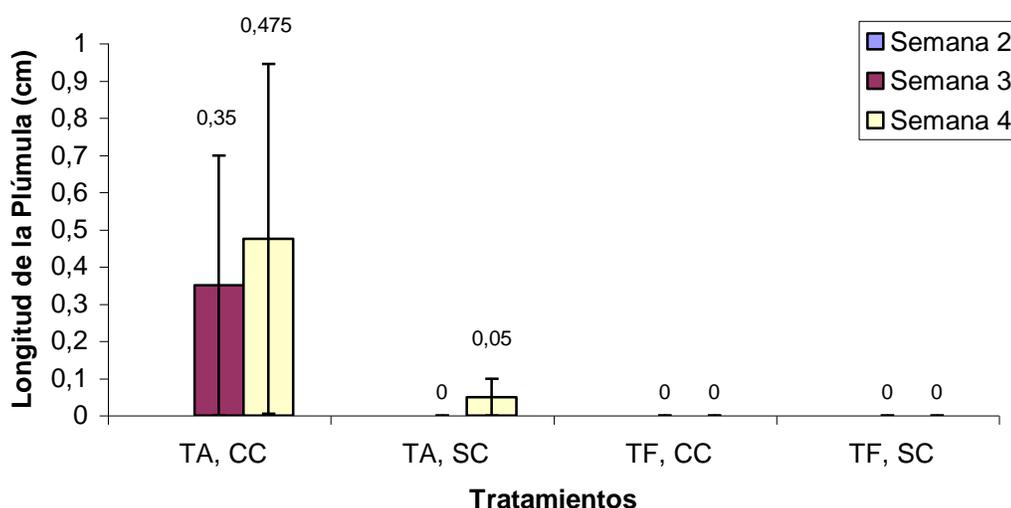


Figura 16. Longitud de la plúmula de semillas de *Prunus brachybotrya* Zucc con endocarpio en diferentes tratamientos durante el cultivo *in vitro*, evaluado a las 2, 3 y 4 semanas a partir de la siembra. TA-Temperatura de laboratorio (23°C), TF-Refrigeración (4°C), CC-Medio Con Carbón Activado, SC-Medio Sin Carbón Activado.

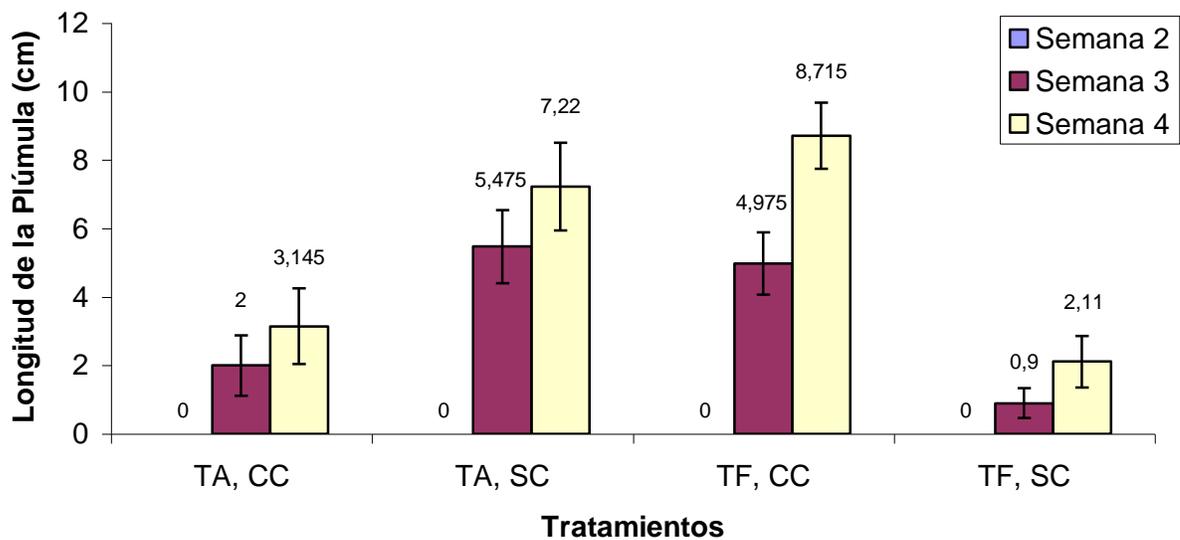


Figura 17. Longitud de la plúmula de embriones extraídos de *Prunus brachybotrya* Zucc, desarrollada *in vitro*, evaluado a las 2, 3 y 4 semanas a partir de la siembra. Tratamientos: TA-Temperatura de laboratorio (23°C), TF-Refrigeración (4°C), CC-Medio Con Carbón Activado, SC-Medio Sin Carbón Activado.

EXPERIMENTO 5: Almacenamiento y germinación de embriones en sustrato

La germinación fue del 100%, a partir de los 38, 45 y 52 días de almacenamiento en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25°C a la sombra. A los 59 días se observó una disminución mínima, alcanzando 92% manteniendo altos los porcentajes de germinación (Figura 18).

La prueba de ANOVA mostró que no existen diferencias significativas en el desarrollo de la radícula de los embriones almacenados durante cuatro periodos ($F=0.953$, $P=0.415866$).

La prueba de ANOVA mostró que existen diferencias significativas en el desarrollo de la plúmula de los embriones, almacenados durante cuatro periodos ($F=4.82$,

P=0.0028), siendo mayor el crecimiento en aquellos evaluados a los 45 días (Figura 19).

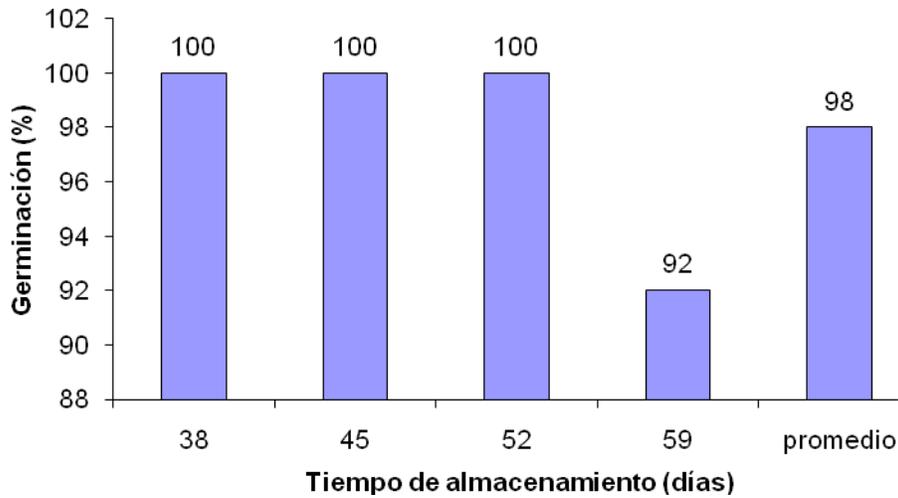


Figura 18. Porcentajes de la germinación de embriones, sembrados en suelo con sustrato comercial de peat moss-agrolita 1:1, durante cuatro tiempos distintos de almacenamiento.

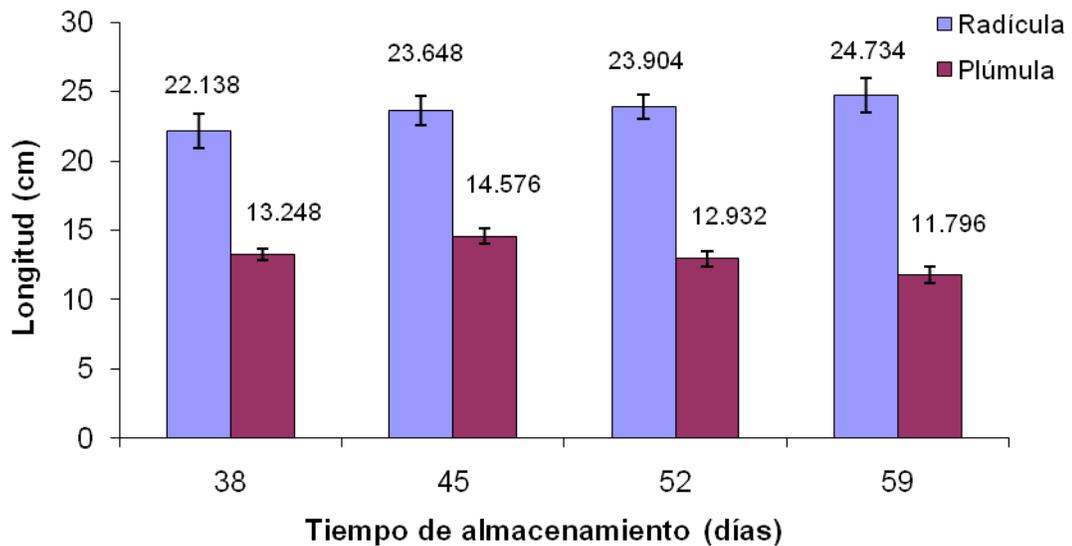


Figura 19. Crecimiento de la radícula y la plúmula de los embriones de *Prunus brachybotrya* almacenados durante cuatro tiempos distintos y sembrados en peat moss-agrolita 1:1 (v/v).

DISCUSIÓN

Información de herbario

El género *Prunus* L. (Rosaceae) se distribuye naturalmente en las regiones templadas del Hemisferio Norte, con algunas especies localizadas en regiones tropicales y subtropicales (Depypere *et al.*, 2009).

Los registros que se encontraron en los herbarios MEXU y ENCB-IPN, mostraron que *Prunus brachybotrya* se distribuye en 13 estados de la República Mexicana, con tendencia a localizarse en la zona Centro – Sureste. Esto concuerda con la distribución de las colectas registradas en el Missouri Botanical Garden, con 101 ejemplares (Figura 20).



Figura 20. Mapa de distribución de *Prunus brachybotrya* en México, de acuerdo a Trópicos, MBG.

Los registros en el estado de Guerrero, de ejemplares con estructuras reproductivas, arrojaron 15 localidades con altitudes que van principalmente desde los 900 m hasta los 2,600 m. De estas 15 localidades, ninguna se refiere a la zona de estudio de El Veladero.

El Veladero, municipio de Acapulco de Juárez, Gro., es un Parque Nacional con 3,159 ha, perteneciente a la provincia fisiográfica Sierra Madre del Sur. Su terreno es accidentado, con altitudes que van de los 300-400 m (Cerro de la Vigia) hasta 900 m (Cerro El Veladero) (Noriega, 1990). Como lo señalan Diego *et al.*, (2004) para el estado de Guerrero, el relieve con distintas altitudes, favorece diferentes tipos de vegetación, por ejemplo: el Bosque Tropical Subcaducifolio a los 450 m, Bosque Tropical Caducifolio a los 590 m y el Bosque de *Quercus* hasta los 900 m. En este último es donde se ubica *P. brachybotrya* a 800 m de altitud. Sin embargo algunos autores reportan que ésta especie se encuentra también como parte del Bosque Mesófilo de Montaña entre los 1650 a 1800 m de altitud, en causes de arroyos y conviviendo con *Prunus samydoides*, *Prunus serotina* var. *capuli*, *Carpinus caroliniana*, *Inga huastecana*, *Juglans mollis*, *Rapanea myricoides*, *Trichilia havanensis*, *Vaccinium leucanthum*, *Turpinia occidentalis* y *Eugenia xalapensis* (Cuevas y Carvajal, 1999; Escutia *et al.*, 2004; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2001).

En los Herbarios consultados hay ejemplares de *P. brachybotrya* con flores o frutos, desde enero hasta diciembre, es decir, su colecta abarca casi todo el año. Las observaciones de campo del presente trabajo, mostraron que efectivamente es largo el periodo en que el árbol presenta estructuras reproductivas, ya que de las tres salidas que se hicieron, en febrero de 2008, se encontró el árbol en floración, en abril, flores y

frutos en desarrollo (sin el desarrollo completo de los cotiledones) y en mayo se observaron frutos verdes, en proceso de maduración y maduros con larvas en el suelo. Tales observaciones coinciden con las referidas por Pérez *et al.*, (1992), quienes mencionan que esta especie fructifica en los meses de mayo a julio en las faldas de los volcanes Popocatepetl e Iztaccihuatl.

Uso medicinal de la especie.

Aunque las referencias bibliográficas para el uso de *P. brachybotrya*, lo señalan para tratar padecimientos como granos en el cuerpo, diarrea o para ayudar al parto (Aguilar *et al.*, 1994), las personas de la comunidad de El Veladero tienen aprecio por las propiedades medicinales para tratar afecciones como: mal de orín, azúcar en la sangre y purificar la sangre, causados por algún susto o coraje. Estos padecimientos tienen como síntomas un aumento de las micciones con dolor, sed y hambre, los cuales corresponden generalmente a personas con problemas de diabetes. (Comunicación personal del M. en C. Armando Gómez Campos).

Dentro del género *Prunus* existen distintas especies con cualidades medicinales y algunas de ellas cuentan con referencias de padecimientos relacionados con aquellos señalados para *P. brachybotrya*, como son: *Prunus occidentalis* Sw, empleada para aliviar padecimientos respiratorios (Muñoz *et al.*, 2001), *Prunus domestica* contiene ácido clorogénico en sus frutos, el cual se ha reportado con actividad ansiolítica y antioxidante (Bouayed *et al.*, 2007), *Prunus serrulata* var. *spontanea* es utilizada en Corea como remedio tradicional para tratar fallas del corazón, beriberi (deficiencia de tiamina), hidropesía (retención de líquidos), mastitis (inflamación e infección de

glándulas mamarias) y actúa como emenagogo (restablece la menstruación); las flores de esta especie llamada cerezo, presentan actividad antioxidante y anticancerígeno; la corteza y los tallos de se utilizan para la desintoxicación (Bo-Bae *et al.*, 2007), lo cual coincide con el uso de purificación de la sangre, que se le da a la especie en estudio *P. brachybotrya*.

Otras especies de *Prunus* también relacionadas con problemas urinarios y purificación de la sangre, son: *P. avium* cuya decocción de los pedúnculos de los frutos se han empleado tradicionalmente como diurético, además de coadyuvante en el tratamiento de las infecciones urinarias e hiperuricemia (presencia en la sangre de un exceso de ácido úrico) (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003). La segunda especie es *P. africana*, cuya corteza reduce los trastornos miccionales asociados al adenoma benigno de próstata, aumentando el flujo urinario y reduciendo el volumen de orina residual (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003; Bruneton, 2001). Y la tercera especie es *Prunus armeniaca* ó chabacano, de la cual se utiliza el cocimiento de su raíz específicamente contra diabetes (Aguilar *et al*, 1994).

Considerando que los pobladores estiman a la especie de zazafrás por los beneficios terapéuticos que les ofrece, han hecho uso de la corteza de los escasos árboles de la zona, lo cual genera el riesgo de exponer al árbol a patógenos que causen daños severos o que la extracción de la corteza alcance tal grado de extensión, que impida la regeneración de los tejidos, provocando su muerte en ambos casos.

Ante tal panorama de escasez de individuos de zazafrás se planteó establecer los procedimientos de propagación, que pudieran aplicar los habitantes de la zona, para

contribuir en la obtención de nuevos ejemplares, con el objetivo de conservar el conocimiento tradicional acerca del uso medicinal y la explotación racional.

Los experimentos de propagación que se realizaron, comprendieron varios ensayos:

El primero fue la recolección de estacas en el mes de febrero, cuyos resultados no fueron favorables en el enraizamiento con Radix a diferentes concentraciones. Le siguieron la recolección de plántulas de 15 a 20 cm de altura, obtenidas del lecho del arroyo en el mes de abril, las cuales no prosperaron en condiciones de invernadero. Debido a esto, se decidió experimentar la germinación de semillas, para lo que se colectaron frutos en el mes de mayo.

Prunus occidentalis presenta fructificación entre los meses de noviembre a diciembre y la madurez ocurre entre marzo y abril; los frutos presentan 2.01 cm de longitud y 1.32 cm de ancho y contienen una semilla (Muñoz *et al.*, 2001). En el caso de *P. brachybotrya* se observaron frutos pequeños desde febrero de 2008, los cuales presentaban endospermo y carecían de cotiledones; en cambio para el 25 de Mayo de 2008, aún cuando los frutos eran verde oscuro, ya presentaban la semilla formada completamente con los cotiledones, se encontraban en proceso de deshidratación y su tamaño era de 1.5 cm de longitud y 1.38 cm de ancho.

Prueba de viabilidad.

Los embriones con mayor viabilidad correspondieron a los colectados del árbol (100%), en comparación con los colectados en suelo (20%). Esto se debe a que los frutos del suelo estaban inoculados con larvas de insectos que se alimentaron tanto del eje embrionario como de cotiledones. De acuerdo a Arguedas (1997), las hembras de

insectos depositan huevos sobre la cáscara de los frutos verdes aún en el árbol, de esta manera, las larvas de hábito barrenador perforan los tejidos de la cáscara y se desarrollan dentro del fruto. Algunas de ellas completan su ciclo de vida dentro de la semilla ó al madurar lo completan fuera.

Por lo anterior, se decidió trabajar sólo con semillas de frutos colectados en el árbol. La recolección de frutos del árbol representó mayor esfuerzo, debido a la altura de las ramas, ya que fue necesario subir al árbol aumentando el riesgo de accidentes al hacer la colecta. Sin embargo, con ello se evitaron los daños debidos al ataque de insectos y enfermedades de bacterias u hongos; en *Prunus africana* se recomienda este procedimiento ya que sus semillas son recalcitrantes de corta vida, susceptibles de pudrirse en el suelo (Vargas *et al.*, 2004).

Las semillas recalcitrantes se caracterizan por su sensibilidad a la deshidratación y una rápida pérdida de viabilidad. Un factor importante en este tipo de semillas son las cubiertas de la semilla y el fruto que funcionan como barreras mecánicas que evitan la deshidratación. Testas duras se presentan en más del 40% de las especies que producen semillas recalcitrantes, mientras los tejidos carnosos que rodean la semilla son a veces suaves y tienen alto contenido de agua. La testa gruesa de las semillas de *Cryptocarya floribunda* Nees., *Osyris lanceolata* Hochst. Steud., *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. y *Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl.; restringen la imbibición e intercambio gaseoso en sus semillas, imponiendo así el estado de latencia física. La impermeabilidad de las cubiertas de la semilla contra el agua y los gases gobierna el equilibrio entre los niveles de latencia física y la viabilidad de las semillas recalcitrantes

(Magnitskiy *et al.*, 2007). En base a estas características, es muy probable que las semillas de *Prunus brachybotrya*, sean de tipo recalcitrante, al igual que *Prunus persica* (Mosella *et al.*, 1991) y *Prunus africana* donde puede obtenerse un índice de germinación de 60-80% si las semillas se plantan dentro de los 50 días de almacenamiento (Cunningham, 2006).

Durante la colecta de semillas en campo, se ubicó un árbol, situado en el lecho de un arroyo que crece en época de lluvias, y cabe mencionar que junto al árbol se encontró un grupo de plántulas, producto de la germinación natural de las semillas.

En *Prunus occidentalis* (Muñoz *et al.*, 2001) una estrategia de supervivencia, es la rápida germinación de sus diseminulos, dando por resultado un banco de plántulas en el mes de Mayo, estrategia de permanencia en el bosque que también ocurre en diferentes especies de estadíos sucesionales avanzados (Herrera *et al.*, 2006). En *P. brachybotrya* de El Veladero se presenta esta proliferación de plántulas cercanas al árbol, y concentradas en la cercanía del arroyo. Sin embargo, en la época de lluvias, el caudal del arroyo aumenta, asfixiando a las plántulas que quedan sumergidas o arrastrando a algunas otras por la fuerza de la corriente, lo cual reduce al mínimo la posibilidad de establecimiento de nuevos individuos.

Otros factores que contribuyen a la ausencia de mayor número de individuos de *P. brachybotrya* en El Veladero, estarían relacionados con el fruto y la semilla, como el ataque de insecto ó si son semillas recalcitrantes (Muñoz *et al.*, 2001).

Se observó que los frutos que se colectaron directamente del árbol, al deshidratarse evidenciaban galerías como producto de la inoculación de larvas (Figura 21). Esta

plaga daña el pericarpio hasta llegar al embrión, limitando la viabilidad de la semilla o provocando su muerte. Esto concuerda con lo reportado por Martínez *et al.*, (2009) sobre los frutos de varias especies forestales que se encuentran maduros y sanos que llegan al suelo, pero perecen al encontrarse con una gran densidad de parásitos y depredadores específicos del área.

Además, aunque las semillas germinan por la cercanía del arroyo que les proporciona condiciones favorables de humedad, el ambiente sombreado por el dosel vegetal, generan un ambiente sombreado que inhibe el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, esta propuesta queda por confirmarse en futuros ensayos, ya que se ha observado que en *Prunus occidentalis* la calidad de la luz no constituye una limitante para su establecimiento (Muñoz *et al.*, 2001). En el caso de *Prunus brachybotrya*, el ensayo para la germinación en invernadero, se llevó a cabo con las semillas enterradas en el sustrato las cuales emergieron cuando estaba lista la plúmula.



Figura 21. Frutos de *Prunus brachybotrya*, colectados directamente del árbol. Una vez deshidratados se evidencian las galerías de tejido dañado por larvas (Ga-galerías).

Prueba de imbibición.

Imbibición. Las semillas de *P. brachybotrya* colectadas tanto en suelo como en el árbol absorbieron de 0.23-0.33 g de agua durante 2:30 hrs, mostrando un posible papel de la cubierta seminal como barrera a la entrada de agua. En el durazno (*Prunus persica*), perteneciente también al mismo género, se ha reportado la presencia de una cubierta dura la cual impide el paso de agua necesaria para que se lleve a cabo la lixiviación de los inhibidores de la germinación (Hartmann y Kester, 1997).

Los frutos de *P. brachybotrya* utilizados en este trabajo, a pesar de tener coloración verde, ya presentaban cotiledones bien formados, lo que reflejaba el estado avanzado de maduración, previo a la etapa de deshidratación y dispersión. Como se reporta en *Prunus domestica*, (García–Mariño *et al.*, 2006), *P. brachybotrya* pudo haber presentado impermeabilidad de las cubiertas (pericarpo y endocarpo), relacionada con la acidez durante el desarrollo del fruto. A medida que avanza la maduración disminuye la acidez y aumenta la permeabilidad, con el consecuente incremento en la absorción de agua.

Los frutos de *P. brachybotrya* pudieron corresponder a una etapa de maduración con características de impermeabilidad, lo cual se reflejó en los bajos porcentajes de imbibición encontrados.

Cabe mencionar, que en comparación con otros reportes, el periodo de imbibición en este caso fue muy pequeño, pudiendo ser esta la causa de los bajos porcentajes. Investigaciones cuyo objetivo fue determinar la relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus*

vulgaris L.) y quinchoncho (*Cajanum cajan* (L.) Mill.), mostraron la mayor tasa de imbibición a las 8, 10 y 10 horas (Méndez *et al.*, 2008).

Germinación *in vitro*.

Con el fin de aproximarse en la mayor medida posible al proceso de germinación natural por medio de tratamientos previos a la siembra, como lo recomienda Piñuela, (2001), se planteó dar el ambiente de germinación en condiciones *in vitro*.

Tomando como referencia el ensayo de imbibición, donde se observó mínima absorción de agua, se planteó hacer una incisión en el endocarpo para permitir la entrada de agua a la semilla. Además, con base en los resultados obtenidos en el cultivo de frutos en sustrato, se decidió realizar el cultivo de embriones *in vitro*, para comprobar si la cubierta seminal ejercía una resistencia mecánica.

Aunque algunas referencias recomiendan exponer las semillas de *Prunus* a condiciones de estratificación a temperaturas bajas, para promover germinación (Daorden *et al.*, 2002), en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas, respecto a este tratamiento.

En cambio, los resultados mostraron que el 98.75 % de los embriones tuvieron crecimiento de la radícula que alcanzó hasta 6 cm de longitud, a diferencia de las semillas con hendidura en el endocarpo, en las que sólo el 27.5 % germinó y la radícula fue de 1 cm de longitud. Esto refleja que el endocarpo, está limitando la germinación, no por impermeabilidad de la misma, como se menciona para *P. domestica*, (García–Mariño *et al.*, 2006), sino que es por resistencia mecánica, como en *Magnolia iltisiana*,

(Saldaña *et al.*, 2001), que impide la expansión del embrión y crecimiento de la radícula, causando retraso en la germinación de semillas.

En los embriones aislados fue evidente el crecimiento de la radícula a partir de la segunda semana después de la siembra, en comparación con las semillas con endocarpo que respondieron hasta la tercera y cuarta semana después del cultivo. Considerando que *Hevea brasiliensis* (caucho), presenta latencia exógena de tipo mecánica, porque el tratamiento de escarificación total mecánico generó mayor porcentaje de germinación y velocidad de germinación, que los tratamientos de ruptura de testa y testa completa (Moreno *et al.*, 2006), entonces los resultados con *P. brachybotrya* permitirían enmarcarla en esta clasificación.

En cuanto a las plántulas que se observaron en campo cuyas semillas no fueron atacadas por insectos, se plantea que su éxito pudo haber estado relacionado con la dispersión, en este caso, de algún ave. Pues como menciona Fuentes (2001), el fruto atrae a los animales por las sustancias nutritivas, por su aroma o coloración. Estas propiedades atractivas, solo se desarrollarán cuando las semillas están maduras y aptas para geminar. De no ser así, el fruto carecerá de estas cualidades además, de tener las semillas encerradas bajo una cubierta dura.

Desarrollo de la plúmula.

La plúmula de embriones aislados inició su crecimiento a partir de la tercera semana después de la siembra, a diferencia de la radícula que inició desde la segunda semana. Al comparar las plúmulas de embriones aislados con las de semillas con endocarpo es evidente que las primeras lograron mejor desarrollo, alcanzando más de 8 cm de longitud en la cuarta semana, a diferencia de las plúmulas de semillas con endocarpo,

que no rebasaron los 0.5 cm de longitud, en el mismo periodo. En semillas de *Magnolia iltisiana*, el autor señala que aun después de la germinación, la testa participa en el aprisionamiento de las hojas cotiledonares debido a la latencia exógena de tipo mecánica, que le impide tanto el despliegue de las hojas cotiledonarias como el crecimiento de la plúmula (Saldaña *et al.*, 2001).

Los tratamientos que favorecieron el crecimiento de la plúmula de *Prunus brachybotrya* fueron con embriones aislados TA SC (Temperatura Ambiente – Sin Carbón Activado) y TF CC (Temperatura de 4° C – Con Carbón Activado); sin embargo para la propagación *in vitro* de esta especie, se recomienda el tratamiento TA, SC, ya que son las condiciones más naturales y el gasto de recursos económicos es mínimo.

Almacenamiento y germinación *in vivo*

Las semillas del género *Prunus* están clasificadas dentro de la categoría de drupas y otros frutos carnosos (Bonner, 1978). En los ensayos de almacenamiento del presente trabajo, las semillas de *Prunus brachybotrya* se mantuvieron con pulpa y se conservaron en charolas con buena ventilación para semejar las condiciones de dispersión en campo; a medida que transcurrió el almacenamiento, la pulpa se iba secando y cada semana era más difícil retirarla ya que la pulpa deshidratada se pega al endocarpo. Bonner (1978), sugiere que para el almacenamiento de semillas, primero es conveniente extraer las semillas del tejido carnoso, debido a que, cuando el fruto está fresco es más fácil. En el caso de la cereza (*Prunus spp.*) se debe quitar la pulpa tan pronto como sea posible para evitar la fermentación o el inicio de los mecanismos de dormancia (Vargas *et al.*, 2004).

A partir de este almacenamiento se obtuvieron los resultados que son analizados a continuación.

En semillas de *P. brachybotrya* con endocarpio, el tiempo de almacenamiento influyó en la respuesta. El periodo en que se obtuvo mejor geminación (38 %), se observó a los 25 días de almacenamiento después de la fecha de colecta; sin embargo periodos más amplios de almacenamiento provocaron que la respuesta disminuyera (16 %). Como se reporta para las especies recalcitrantes, el alto contenido de humedad atenta contra la longevidad de la semilla haciendo que pierda viabilidad (Lines *et al.*, 2006). Esto ocurre en *P. occidentalis*, cuyas semillas almacenadas durante dos meses, presentaron germinación nula al ser sembradas (Muñoz *et al.*, 2001) y en *Calophyllum brasiliense*, donde se observó que después de un mes, los porcentajes de germinación disminuyeron radicalmente (Lines *et al.*, 2006).

La longitud de la radícula y de la plúmula se manifestó en forma ascendente en los primeros tres lotes. El que corresponde a los 25 días de almacenamiento, mostró los valores más altos; sin embargo a los 32 días hubo un descenso en el crecimiento de ambos órganos de la plántula, relacionados posiblemente a algún deterioro influenciado por factores como temperatura y humedad de la semilla, como sucede en el café (Barboza y Herrera, 1990), que determinan la pérdida de viabilidad.

Por otra parte, mientras mayor es el tiempo de almacenamiento, la resistencia mecánica que ejerce la cubierta va disminuyendo. Esto propicia que la cubierta pierda dureza, permitiendo el hinchamiento de los cotiledones, la emergencia de la radícula y posteriormente la plúmula. En condiciones naturales las semillas necesitan que se deterioren las cubiertas que las rodean, esto se produce en muchos casos tras pasar

por los estómagos de las aves que se alimentan de sus frutos o por la acción microbiana (Piñuela, 2001).

Una vez efectuadas las evaluaciones del almacenamiento de las semillas con endocarpo, en donde la máxima germinación fue cercana al 40 %, se evaluó la respuesta de los embriones sin endocarpo. En general, los lotes de embriones, de frutos almacenados por 38, 45, 52 y 59 días, mostraron los máximos porcentajes de germinación, a excepción del último lote donde se observó un pequeño descenso, pero fue superior al 90%. Esto reveló el efecto limitante del endocarpo hacia la expansión del embrión, ya que como lo mencionan Baskin y Baskin (1998), las semillas de algunas especies no germinan debido a la resistencia mecánica que impide la expansión del embrión hidratado.

El desarrollo de la radícula y plúmula en embriones almacenados por cuatro tiempos diferentes, fue más homogénea que en las semillas con endocarpo. En estas últimas, el lote almacenado durante 25 días permitió obtener mejor respuesta con radículas de 4.8 cm de longitud y plúmulas que no rebasaron el centímetro de largo. En cambio, en embriones que se obtuvieron de frutos almacenados, el crecimiento fue homogéneo. En los cuatro lotes, la longitud de la radícula va de los 22-24 cm, mientras que la plúmula creció de 11-14 cm; la mayor longitud de radícula se alcanzó a los 59 días de almacenamiento; en cambio la mayor longitud para plúmula se obtuvo a los 45 días.

El conjunto de experimentos permite señalar que *P. brachybotrya* presenta endocarpo con resistencia mecánica, que actúa como barrera al limitar la germinación, 73 % *in vitro* y 60% *in vivo*. Esto permite a la especie un establecimiento de plántulas de menos de la mitad de los frutos producidos, rango que se puede ampliar con la degradación de

la cubierta que realizan algunos dispersores como las aves (Piper, 2006) y posiblemente mamíferos (Phartyal, 2009).

In vitro vs In vivo

En condiciones *in vitro*, se observa mayor elongación de la radícula en la tercera y cuarta semana, sin diferencias significativas en el tratamiento TA, SC; comparado con la respuesta *in vivo*, donde la mayor longitud se logró a las tres semanas (25 días).

Los embriones aislados que se cultivaron *in vitro*, a los 36 días de almacenamiento en refrigeración, alcanzaron máximo porcentaje de germinación cercano al 100 %, similar a la respuesta de los embriones con 38 días de almacenamiento a temperatura de laboratorio, que se sembraron *in vivo*. Sin embargo, las plántulas obtenidas de la siembra *in vivo* fueron más vigorosas, dado que las radículas crecieron hasta 24 cm y las plúmulas hasta 14 cm, a diferencia de las sembradas *in vitro*, con radículas de 6 cm y plúmulas de menos de 0.5 cm. A pesar de que en el cultivo *in vitro*, el medio estaba suplementado con macronutrientes, micronutrientes y hormonas, se observa que estos no tienen influencia en el desarrollo de la radícula y plúmula. Esto coincide con la germinación de *Mastichodendron foetidissimum*, en donde la transferencia de reservas seminales, prioriza el crecimiento y desarrollo de radícula, posteriormente, el epicotilo y los primordios foliares inician su crecimiento activo por la actividad fotosintética. La formación de un sistema radical fuerte, garantiza plántulas vigorosas y competitivas (Torres-Arias *et al.*, 2000). Por otra parte, los propágulos de *Rhizophora mangle*, contienen reservas de carbohidratos suficientes para iniciar el crecimiento de la plúmula y las raíces; complementado con la maquinaria básica para comenzar la

fotosíntesis, numerosos estomas, abundante clorofila y haces vasculares (Smith and Snedaker, 2000).

Con base en los resultados analizados, para la propagación de *Prunus brachybotrya*, se recomienda colectar frutos durante la segunda mitad de mayo, directamente del árbol; retirar la pulpa, almacenarlos por 38 días a temperatura ambiente con buena ventilación, sembrar embriones en peat moss-agrolita 1:1 (v/v), regando con agua corriente cada tercer día y de ser posible una vez al mes con raizal (0.5 g/L). Una vez que germinen se sugiere trasplantar las plántulas a un sustrato más rico en nutrientes como tierra de hoja.

En el almacenamiento de las semillas de *P. brachybotrya*, es importante retirar la pulpa mientras esté húmeda, debido a que es más fácil, pero sobre todo se previene la acción negativa de insectos que inoculan la semillas desde el árbol.

En los experimentos 3, 4 y 5 realizados para la germinación, se utilizaron 560 semillas, de las cuales se obtuvieron 220 plantas con tallos de 20-30 cm de longitud, equivalente a casi el 40%, establecidos en maceta con sustrato y materia orgánica; estas correspondieron principalmente a los embriones cultivados tanto en *in vivo* como *in vitro*. El resto de las semillas no tuvieron éxito, algunas no presentaron germinación y las que lograron sobrevivir hasta el trasplante, murieron a causa del ataque en las hojas de un hongo dentro del invernadero, este fue controlado mediante la aspersión de un fungicida.

Las plantas que sobrevivieron se entregaron el mes Junio de 2009, a las autoridades de dos comunidades del estado de Guerrero. La primera, al Comisario Municipal de El Veladero, el Sr. Gumercindo Velez Astudillo, el cual recibió 150 plantas de zazafras, y

en la segunda al Comisario Municipal de Tepango, Municipio de Ayutla de los Libres, el Sr. Pedro Saturnino Hernández, a quien se le donaron 70 plantas de zazafras. Dicha entrega se realizó con la finalidad de que los pobladores incluyan en sus huertos familiares a *P. brachybotrya*, para tener mayor acceso a su corteza, de esta manera se pretende que promuevan y mantengan el conocimiento tradicional que tienen acerca de su uso medicinal.

Con toda la información que se generó a partir de esta investigación, se propone que los pobladores de El Veladero, realicen la propagación *in situ* con fines de conservación de la especie y comercialización de la corteza de zazafras, como una alternativa de ingreso económico. Sin embargo, es una especie con mucho potencial, de la que se puede aprovechar más que su corteza. De acuerdo a Quintanar *et al.*, (1998), *Prunus brachybotrya* puede sustituir a especies de importación y con ello proveer al mercado nacional de madera de alta calidad para usos tan específicos como la elaboración de instrumentos musicales como el violín. Ibarra-Manríquez *et al.* (1997), coinciden en que la especie tiene potencial en el mercado por contener buena madera y resaltan su uso como leña en los Tuxtlas.

Además de los beneficios económicos que podría brindar la propagación de esta especie a través de programas de silvicultura, su reforestación podría ayudar a la conservación de especies altamente amenazadas. En investigaciones realizadas por Solórzano *et al.* (2000) se encontró que la abundancia de el Quetzal (*Pharomachrus mocinno*) está relacionada con la disponibilidad de frutos dentro de los que se encuentran los de *Prunus brachybotrya* como parte de su dieta.

CONCLUSIONES

Prunus brachybotrya, se distribuye, principalmente en el sureste de México. En el estado de Guerrero, desde los 900 hasta los 2600 m de altitud formando parte del bosque de *Quercus*.

En El Veladero, Gro., la floración de *Prunus brachybotrya*, comienza en Febrero y en Mayo, tiene frutos verdes con cotiledones formados.

Para la propagación de *Prunus brachybotrya* se deben coleccionar frutos directamente del árbol, porque tienen 100% de viabilidad. Los que están en el suelo tienen ataque de insectos, que disminuyen su viabilidad.

La entrada de agua durante 2:30 hrs fue de 0.23-0.33 g, sin embargo la impermeabilidad no es una limitante para la germinación.

A pesar de que el cultivo *in vitro* le proporcionó todos los nutrientes a las semillas con endocarpo, su germinación no superó el 27.5%.

El cultivo de embriones en sustrato peat moss-agrolita 1:1 v/v, almacenados por 38 días, fue el ensayo que arrojó los mejores resultados de germinación y plántulas más vigorosas, y resulta la mejor manera de propagar esta especie *in situ*.

Las semillas de *P. brachybotrya* son drupas con una sola semilla y endocarpio duro que le confiere resistencia mecánica a la expansión de los embriones.

REFERENCIAS

- Aguilar, A., R. Camacho, S. Chino, P. Jácquez, y E. López. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Primera Edición. Redacta, S. A. México. 253 p.
- Aguilar-Rodríguez, S., L. Abundiz-Bonilla, y J. Barajas-Morales. 2001. Comparación de la gravedad específica y características anatómicas de la madera de dos comunidades vegetales en México. Serie Botánica 72: 171-185.
- Arguedas, M. 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Serie Técnica. Manual Técnico No. 2. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 120 p.
- Barboza, R., y J. Herrera. 1990. El vigor en la semilla de café y su relación con la temperatura de secado, el contenido de humedad y las condiciones de almacenamiento. Agronomía Costarricense 14: 1-8.
- Baskin, C. C. and J. M. Baskin. 1998. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press. San Diego, California. 666 p.
- Bewley, D. J. and M. Black. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. Segunda Edición. Plenum Press. New York, N. Y. pp: 199-266.
- Bo-Bae, L., CH. Mi-Ran, K. Soo-Yeon, P. Eunju, P. Hae-Ryong, and L. Seung-Cheol. 2007. Antioxidative and anticancer activity of extracts of cherry (*Prunus serrulata* var. *spontanea*) Blossoms. Plant Foods Hum. Nutr. 62: 79–84.
- Bonner F.T. 1978. Almacenamiento de semillas de latifolias. Información sobre recursos genéticos forestales. Núm. 7. Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Roma.

<www.fao.org/docrep/006/l1807s/L1807S02.htm> [Acceso en noviembre de 2009].

Bouayed, J., H. Rammal, A. Dicko, CH. Younos, and R. Soulimani. 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J. of the Neurological Sci.* 262: 77–84.

Bruneton, J. 2001. *Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales*. Acricia, S.A. Zaragoza, España. 162 p.

Caballero, J., A. Casas, L. Cortés, y C. Mapes. 1998. Patrones en el conocimiento, uso y manejo de plantas en pueblos indígenas de México. *Estudios Atacameños* 16: 181-195.

Canter, P. H., H. Thomas, and E. Ernst. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 23: 180-185.

Castillo, F. y S. Castellvi. 2001. *Agrometeorología*. Segunda Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 317-327.

Cuevas, G. R., y H. S. Carvajal. 1999. *Trophis noraminervae* (Moraceae), una nueva especie para la Sierra de Manantlan, Jalisco, Mexico. *Acta Bot. Mex.* 47: 1-7.

Cunningham, A. B. 2006. Examen del comercio significativo de *Prunus africana*. *In: Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres*. PC16 Doc. 10.2. Decimosexta reunión del Comité de Flora. Lima, Perú. <<http://www.cites.org/esp/com/pc/16/S-PC16-10-02.pdf>> [Acceso en mayo de 2011].

- Daorden, M. E., J. A. Marín, y A. Arbeloa. 2002. Germinación *in vitro* de embriones inmaduros a distintas temperaturas de estratificación. ITEA. 98: 71-80.
- Depypere, L., P. Chaerle, P. Breyne, K. V. Mijnsbrugge, y P. Goetghebeur. 2009. A combined morphometric and AFLP based diversity study challenges the taxonomy of the European members of the complex *Prunus* L. section *Prunus*. *Plant. Syst. Evol.* 279: 219–231.
- Diego-Pérez, N. y R. Fonseca. 2004. Estudios Florísticos en Guerrero. Las prensas de Ciencias, UNAM. México. 34 p.
- Escutia, J. A., C. Ruiz-Jiménez, e I. Luna. 2004. Modificación Del formato P (unidades de muestreo del bosque) en el bosque mesófilo de montaña de Lolotla, Hidalgo, México. <<http://hdl.handle.net/10535/342>> [Acceso en junio de 2010].
- García, B. J., J. C. Roselló y M. P. S. Santamarina. 2006. Introducción al Funcionamiento de las Plantas. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp: 146-159.
- García-Mariño, N., F. de la Torre y A. J. Matilla. 2006. Contribución del pericarpo y endocarpo al nivel de ácidos orgánicos y azúcares solubles durante el desarrollo del fruto de mirabel (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia* var. *Syriaca*). *Plant Physiol.* 131: 1566-1575.
- Goldhaber, P. G. 2008. Inducción de cultivos *in vitro* de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-ligustilida. Tesis de Maestría, Instituto de Biología, UNAM, México. 205 p.
- Hartmann, H. T., y D. E. Kester. 1997. Propagación de plantas: Principios y Prácticas. Continental. México, D.F. pp: 42-50.

- Hernández, A. Y. 2007. Estudio etnobotánico de los huertos familiares en el ejido el Veladero, Municipio de Acapulco de Juárez, Guerrero. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 96 p.
- Herrera, J., R. Alizaga, E. Guevara y V. Jiménez. 2006. Germinación y Crecimiento de la Planta. Primera Edición. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp: 28-41.
- Ibarra-Manríquez, G., M. Ricker, G. Angeles, S. Sinaca, and M. Sinaca. 1997. Useful plants of the Los Tuxtlas rain forest (Veracruz, México): considerations of their market potential. *Eco. Bot.* 51: 362-376.
- Lines, K., J. Herrera, y W. Vásquez. 2006. Estudio de la germinación y la conservación de semillas de cedro maría (*Calophyllum brasiliense*). *Tecnología en Marcha* 19: 61-72.
- Magnitskiy, A. V., y G. A. Plaza. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agro. Colom.* 25: 96-103.
- Malda, G., H. Suzán, y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci. Hort.* 81: 71-87.
- Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México. Quinta edición. Ediciones Botas. México. 62 p.
- Martínez, R., G. Rojo, J. Jasso, y P. Vázquez. 2009. Manejo y almacenamiento de semillas forestales. *Tecnologías de granos y semillas. Libros técnicos, serie Agricultura.* Primera edición. México. pp: 217-261.

- Medina, G. C., F. Guevara-Féfer, R. M. Martínez, P. Silvia-Sáenz, M. Chávez-Carvajal, y R. I. García. 2000. Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Acta Bot. Mex.* 52: 5-41.
- Méndez, N. R., F. M. Pinto, y J. M. Mata. 2008. Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Mill.). *UDO Agrícola* 8: 61-66.
- Moreno, F., G. Plaza, y M. Magnitskiy. 2006. Efecto de la testa sobre la germinación de las semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agro. Colom.* 24: 290-295.
- Morgan, R.M., E. D. Soltis, and R. K. Robertson. 1994. Systematic and evolutionary implications of *RBCL* sequence variation in Rosaceae. *Am. J. Botany* 81: 890-903.
- Mosella, L. C., y L. Ascui. 1991. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. *In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones.* Roca, W. M. y L. A. Mroginski. (eds.). CIAT. Cali, Colombia. pp: 514.
- Muñoz, C. B., A. J. Sánchez, L. Montejo, y A. R. Herrera-Peraza. 2001. Características morfológicas y fisiológicas de semillas de *Prunus occidentalis*: comparación entre especies de diferentes estrategias sucesionales. *Ecotropicos* 14: 1-10.
- Noriega, A. N. 1990, Estudio florístico del Parque Nacional El Veladero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 65 p.
- OMS, Nota de información sobre el país.
<http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccsbrief_mex_es.pdf>
[Acceso en enero de 2011].

- Pérez, L. J., M. F. Genis, M. R. Rosiles, y R. J. Horta. 1992. Variación del contenido de cianuro en *Prunus brachybotrya* en la segunda mitad de su desarrollo. Vet. Méx. 23: 131-133.
- Phartyal, S., S. Godefroid, y N. Koedam. 2009. Seed development and germination ecophysiology of the invasive tree *Prunus serotina* (Rosaceae) in a temperate forest in Western Europe. Plant Ecol. 204: 285–294.
- Pérez, O. C., A. M. Mendoza, R. J. Ceja, y L. Pacheco. 2008. Anatomía de la madera de cinco especies de la familia Rosaceae. Madera y Bosques 14: 81-105.
- Piñuela, J. 2001. Efecto de la pérdida de humedad sobre la germinación de las semillas de alupay (*Euphoria didyma* Blanco). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Tesis de Licenciatura. El Zamorano, Honduras. 25 p.
- Piper, J. 2006. Colonization of Tubú (*Montanoa guatemalensis*, Asteraceae) windbreaks by woody species. Biotropica 38: 122-126.
- Quesada, H. A. 2008. Las plantas medicinales. Revista fitoterapia. 21: 20-23.
- Quintanar, I. A., H. M. De Icaza, N. L. Rivera, y O. C. Pérez. 1998. Algunas características anatómicas y acústicas de tres especies de angiospermas de Huayacocotla, Ver. Madera y Bosques. 4: 15-25.
- Raven, P. H., R. F. Evert y S. E. Eichhorn. 1992. Biología de las Plantas. Cuarta Edición. Reverté. Barcelona, España. pp: 381-382.
- Retes-Pruneda, J. L., M. L. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes, y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagation *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*,

- Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). Boletín Soc. Bot. Méx. 81: 9-16.
- Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970 p.
- Romay, G., J. Matehus, A. Gersti, R. Rueda, y M. A. Santana. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. Scielo. 31: 686-689. <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000900012&lang=pt> [Acceso en febrero de 2011].
- Rzedowski, J. 1994. Vegetación de México. Limusa Noriega Editores. México. 6^a reimpresión. 432 p.
- Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski. 2005. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 135. pp: 1-159.
- Saldaña, A. A., M. Zuloaga Aguilar, y E. Fardel Peláez. 2001. Germinación de *Acer skutchii* Rehder y *Magnolia iltisiana* Vázquez en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco, México. Foresta Veracruzana 3: 1-8.
- Smith, S. and S. Snedaker. 2000. Hypocotyl function in seedling development of de red mangrove, *Rhizophora mangle* L. Biotropica 32: 677-685.
- Solórzano, S., S. Castillo, T. Valverde, y L. Ávila. 2000. Quetzal abundance in relation to fruit availability in a cloud forest in Southeastern Mexico. Biotropica 32: 523-532.

- Sotiropoulos, T.E., K.N. Dimassi, V. Tsirakoglou, y I.N. Therios. 2006. Responses of two *Prunus* rootstocks to KCl induced salinity *in vitro*. *Biología Plantarum* 50: 477-480.
- Torres-Arias, Y., R. Herrera-Peraza, J. Sánchez, y A. Martell. 2000. Algunos aspectos de las estrategias reproductivas de *Mastichodendron foetidissimum* (jacq.) Cronq. *Ecotropicos* 13: 97-102.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 05 Abril 2010 <<http://www.tropicos.org/Name/27801751>>.
- Valadez, B. 2009. Por epidemia de diabetes peligran finanzas del IMSS. En: Milenio.com <<http://www.milenio.com/node/334441>> [Acceso en enero de 2011].
- Vanaclocha, B. y S. Cañigüeral. 2003. *Fitoterapia*. Cuarta edición. Masson S. A. Barcelona, España. 410 p.
- Vargas, H., J. Jesús, V. Basilio Bermejo, y F. Thomas Ledig. 2004. Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. 209 p.
- Villegas, A., R. Sarimento, C. Mazuelos, J. L. García and A. Troncoso. 1992. Influence of the nitrogen source and concentration on N fractions and free amino acid levels of grape vine explants. *Plant and Soil*. 144: 255-258.
- Willan, R. L. 2000. Pre-tratamiento de Semillas. *In: Técnicas para la germinación de semillas forestales*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. pp: 15-32.