



“Enseñar la explotación de la  
tierra, no la del hombre”

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

**META ANÁLISIS DE PROPORCIONES DE LOS PROCESOS DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *Pinus L.***

**TESIS**

**Que como requisito parcial  
para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

**Presenta:**

**REMEDIOS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**Bajo la supervisión de:**

**DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O**



**APROBADA**



Chapingo, Estado de México, noviembre de 2021.

**META ANÁLISIS DE PROPORCIONES DE LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *Pinus L.***

Tesis realizada por **REMEDIOS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

DIRECTOR: \_\_\_\_\_

  
DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
DRA. ADRIANA ÁVALOS VARGAS

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
M. C. ROLIN GRANADOS VICTORINO

## CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>DATOS BIOGRÁFICOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 Objetivo general .....	13
1.1.2 Objetivos particulares.....	13
<b>2. MARCO TEORICO Y DE REFERENCIA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Marco teórico.....	14
2.1.1 Cultivo de tejidos vegetales.....	14
2.1.2 Métodos de esterilización y condiciones asépticas .....	14
2.1.3 Medio de cultivo .....	15
2.1.4 Embriogénesis somática .....	21
2.1.5 Meta análisis .....	23
2.2 Marco de referencia .....	26
2.2.1 La biotecnología en los recursos forestales .....	26
2.2.2 Estudios realizados con los procesos de embriogénesis somática en México .....	27
2.2.3 Algunos estudios realizados con los procesos de embriogénesis somática en el mundo.....	28

2.2.4 El Meta-análisis en la Agricultura .....	32
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>36</b>
<b>3. META ANÁLISIS DE PROPORCIONES DE LOS PROCESOS DE</b>	
<b>EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO <i>Pinus</i> L.....</b>	<b>41</b>
RESUMEN: .....	41
ABSTRACT: .....	42
INTRODUCCIÓN .....	43
MÉTODOS .....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Vitaminas más usadas en los medios de cultivo en mg L .....	20
Tabla 2: Características de los estudios incluidos en el meta análisis.....	45
Tabla 3: Id de estudios, especie, variables analizadas (Explante, tipo de explante y sales minerales) .....	49

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gráfico forest de los tamaños del efecto por estudio. .... 47
- Figura 2: Pruebas de diagnóstico para detectar outliers y estudios influyentes.47

## DEDICATORIA

*A mi hermana Eva (†) que a su manera le ganó la batalla a la depresión. Espero firmemente poder coincidir contigo en otra vida.... Te amaré eternamente aún después de irme de éste mundo, porque creo que existen otros lugares mejores que este, en el que nos tocó vivir.*

*A todos aquellos que están luchando contra la ansiedad, depresión, o cualquier otro trastorno, deseo de todo corazón que salgan victoriosos, que libren la batalla, y que descubran lo que del otro lado les espera, y puedan cumplir sus sueños.*

*Para los que se fueron intentando superar sus miedos, no son perdedores ni cobardes, solo no hubo quien pudiera hacerles ver lo maravillosos que eran.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT por el financiamiento a la presente investigación.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por la dirección del presente trabajo.

A la Dra. Amparo por su ayuda incondicional, y sobre todo le agradezco infinitamente por creer en mí.

A mi asesora la Dra. Adriana Ávalos por su apoyo desde el inicio de mis estudios de maestría, por su paciencia y dedicación al presente trabajo, por ser mi guía en momentos difíciles y por siempre darme una solución.

A todos mis profesores de la maestría por compartir conocimiento valioso.

.



## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **DATOS PERSONALES**

NOMBRE: Remedios Hernández Hernández

FECHA DE NACIMIENTO: 29 de agosto de 1993

LUGAR DE NACIMIENTO: Libres, Puebla, México

CURP: HEHR930829MPLRRM08

PROFESIÓN: Ingeniero Forestal

CÉDULA PROFESIONAL: 11091844



### **DESARROLLO ACADEMICO**

BACHILLERATO: Colegio de Bachilleres del estado de Puebla P-25

LICENCIATURA: Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla

ESPECIALIDAD: Conservación y restauración de ecosistemas forestales.

## RESUMEN

### **META ANÁLISIS DE PROPORCIONES DE LOS PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *Pinus* L.<sup>1</sup>**

El género *Pinus* L. se destaca por su importancia ecológica, económica y cultural, ya que de él derivan muchos bienes y servicios que aprovecha el ser humano, tales como madera, leña, semillas comestibles, resinas, captura de carbono (como CO<sub>2</sub>), filtración de lluvia a los mantos acuíferos, oxígeno (O<sub>2</sub>), y más. En este trabajo se recopiló una base de datos de 13 estudios, que representaron 18 unidades de análisis, las cuales fueron usadas para calcular el tamaño del efecto de cada unidad y la heterogeneidad entre estudios. Este trabajo tiene como objetivo demostrar mediante un meta análisis de proporciones que los procesos de embriogénesis somática deben ser adaptados a cada especie del género *Pinus* L., en función de sus requerimientos ambientales y nutricionales. De acuerdo con los tamaños del efecto cada estudio analizado tiene una heterogeneidad entre estudios muy alta, e incluso podemos notar que en el modelo de efectos aleatorios a excepción del estudio 1, la mayoría de resultados difieren del resultado final del meta análisis, dado que la línea imaginaria vertical no cruza sus intervalos de confianza. En cambio, la línea imaginaria vertical del modelo de efectos fijos cruza dos estudios que corresponden a 3 unidades analizadas (1, 8 y 9), lo que indica que estos estudios no difieren del resultado final del meta análisis.

**Palabras clave:** Biotecnología, Tamaño del efecto, Variables, Unidades analizadas, Análisis estadístico.

<sup>1</sup>Tesis de maestría en ciencias en ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo.  
Autor: Remedios Hernández Hernández  
Director de tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O.

## ABSTRACT

### META ANALYSIS OF PROPORTIONS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS PROCESSES IN THE GENUS *Pinus* L.<sup>2</sup>

The genus *Pinus* L. stands out for its ecological, economic and cultural importance, since from it derive many goods and services that the human being uses, such as wood, firewood, edible seeds, resins, carbón (as CO<sub>2</sub>) sequestration, filtration of rain to the aquifers, oxygen (O<sub>2</sub>), and more. In this work, a database of 13 studies was compiled, representing 18 units of analysis, which were used to calculate the effect size of each unit and the heterogeneity between studies. This work aims to demonstrate through a meta-analysis of proportions that somatic embryogenesis processes must be adapted to each species of the genus *Pinus* L., depending on their environmental and nutritional requirements. According to the effect sizes, each study analyzed has a very high heterogeneity between studies, and you can even notice that in the random effects model except study 1, the most results differ from the final result of the meta analysis, since the vertical imaginary line does not cross its confidence intervals. In contrast, the vertical imaginary line of the fixed effects model crosses two studies corresponding to 3 units analyzed (1, 8 and 9), which indicates that these studies do not differ from the final result of the meta analysis.

**Key words:** Biotechnology, Effect size, Variables, Units analyzed, Statistic analysis.

<sup>2</sup>Tesis de maestría en ciencias en ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo.  
Autor: Remedios Hernández Hernández  
Director de tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es un país con una importante riqueza natural, de la cual destacan sus distintos ecosistemas y, uno de ellos son los bosques de pino. México posee 47 especies de pinos de un total aproximado de 111 existentes en el mundo (Manzanilla - Quiñones, Aguirre - Calderón, & Jiménez - Pérez, 2018).

El género *Pinus L.* se destaca por su importancia ecológica, económica y cultural (Sánchez-González, 2008); su potencial adaptativo en algunas especies es alto al crecer en lugares con poca precipitación, altitudes superando los 3000 msnm como lo es *Pinus hartwegii* Lindl. Además, las semillas de este género son recolectadas para su comercialización (atendiendo a la producción de planta nueva para reforestaciones y/o estudios de mejoramiento genético y biotecnología) y, autoconsumo como lo son las semillas de los pinos piñoneros, de ahí que se destaca su importancia para conservar y propagar las especies.

Por ello se debe tomar en cuenta la prioridad actual de propagar dichas especies, asegurando que mantengan sus características de calidad y que además exista una elevada producción y, así mismo se conserven. La multiplicación masiva logra ese objetivo a través de la propagación vegetativa (micropropagación), evitando así la pérdida de las características de calidad de las especies (Rebolledo, Aparicio, & Cruz, 2006).

Es así que la propagación clonal es un método adecuado para crear nuevos protocolos para la preservación de genotipos con alguna importancia ya sea económica, cultural y ecológica.

Una de las técnicas más utilizada en la propagación clonal es la embriogénesis somática, que se lleva a cabo mediante el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de la especie a propagar. Es una técnica biotecnológica de gran importancia para la conservación no solo de las especies, sino que también garantiza la

variabilidad genética de éstas, además de conservar sus características de calidad.

Por lo anterior es de gran importancia conocer mediante un meta análisis la heterogeneidad que existe entre los protocolos de los procesos de embriogénesis somática realizados en especies del género *Pinus* para la propagación clonal óptima, tomando en cuenta que estos no pueden ser generalizados para todas las especies del género, sino que deben ser adaptados para cada una.

El meta análisis al ser el análisis estadístico de una gran colección de resultados de trabajos individuales y, tener como propósito integrar de forma objetiva y sistemática los resultados de estudios empíricos acerca de un problema de investigación (Sanchez-Meca, 2010), resulta una estrategia idónea para deducir heterogeneidad entre estudios, y de esta forma demostrar que cada especie del género *Pinus* L., debe contar con su protocolo de embriogénesis somática atendiendo sus requerimientos ambientales y nutricionales individualmente.

## **OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

Demostrar mediante un meta análisis de proporciones que los procesos de embriogénesis somática deben ser adaptados a cada especie del género *Pinus* L., de acuerdo a sus requerimiento ambientales y nutricionales.

### **1.1.2 Objetivos particulares**

1. Recopilar una base de datos con al menos 15 observaciones de los procesos de embriogénesis somática en el género *Pinus* L., para realizar un meta análisis de proporciones.
2. Calcular el tamaño del efecto de cada uno de los estudios para estimar la heterogeneidad entre ellos.
3. Deducir si existe heterogeneidad entre estudios mediante un gráfico forest.

## **2. MARCO TEORICO Y DE REFERENCIA**

### **2.1 MARCO TEÓRICO**

#### **2.1.1 Cultivo de tejidos vegetales**

Todas las células somáticas de una planta se originan por mitosis a partir del cigoto. Además, todas las células de la planta son totipotentes (es decir, cada célula es capaz de originar una nueva planta idéntica a la planta madre) y, es así como se define el principio básico del cultivo de tejidos vegetales, que es la aplicación de la totipotencia celular para generar plantas a partir de células aisladas, no diferenciadas o a partir de órganos y tejidos vegetales (Pargas, Murillo, & Ruíz, 2014).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es el cultivo aséptico de células, órganos, tejidos o plantas completas (todos ellos también llamados explantes), bajo condiciones ambientales y nutrimentales controladas para producir clones de plantas. Los clones resultantes tienen la misma calidad genética que la planta madre. Las condiciones controladas dan como resultado para el cultivo un medio apto para su crecimiento. Dentro de las principales condiciones a ser controladas son: niveles de pH, nutrientes, temperatura adecuada, además se regulan los periodos de luz–obscuridad (fotoperiodos) si es necesario (Hussain, Qarshi, Nazir, & Ullah, 2012 a).

#### **2.1.2 Métodos de esterilización y condiciones asépticas**

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la presencia de hongos, bacterias y virus, los cuales se pueden encontrar en el aire (cuando se hace la siembra), en el mismo explante e incluso en los utensilios que se ocupan para sembrar, en ocasiones también pueden ser transportados por el mismo personal que realizar la siembra. Es por ello que una de las piezas importantes para tener éxito en el cultivo son los

métodos de esterilización del medio, utensilios e incluso las condiciones asépticas del personal a realizar la siembra.

El método más común de esterilización es el de vapor húmedo, empleando autoclaves que actúan con vapor a presión. Generalmente el tiempo que se emplea para una buena esterilización es de 15 minutos a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y a una temperatura de 120-121 °C, el tiempo debe ser mayor cuando los volúmenes son grandes. La cristalería también se puede esterilizar por calor seco en una estufa a 150 °C por 2 o tres horas (Merino M. E., 2014).

Las pinzas y mangos de bisturí pueden ser sumergidas en una solución de Timcen por 10 minutos antes de ser utilizadas en la siembra, es importante que se estén flameando durante la siembra para tener una mejor condición aséptica.

Para el material vegetativo a utilizar comúnmente se utiliza detergente comercial, Tween, hipoclorito de sodio, alcohol y agua esterilizada, además del uso de la campana de flujo laminar durante la siembra.

### **2.1.3 Medio de cultivo**

El objetivo del medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. En los primeros estudios los investigadores solían suministrar los elementos por medio de soluciones de cultivo de tres sales: Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y Sulfato de Magnesio (MgSO<sub>4</sub>), incluían fosfato ferroso Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Krikorian, s.f).

Un medio de cultivo debe estar compuesto por sales minerales (base), macronutrientes, micronutrientes, sacarosa, vitaminas, materiales de soporte, y reguladores de crecimiento. La principal fuente de sacarosa es la azúcar común, en algunas ocasiones se ocupa azúcar fabricada especialmente para cultivo de tejidos. También se recomienda ajustar el pH del medio a 5.7 ± 0.1, ya que a este nivel los nutrientes son mejor absorbidos por la planta (Merino M. E., 2014).

## **Sales minerales (base)**

Se han realizado muchas investigaciones con el fin de obtener un medio base para poder cultivar diferentes especies, pero debido a los diferentes requerimientos de cada especie, se han creado diferentes mezclas de sales para poder propagar las diferentes especies. En 1962 Murashige y Skoog desarrollaron el medio MS con las concentraciones más altas de sales (Hussain, Qarshi, Nazir, & Ullah, 2012 a).

Las sales MS contienen nitrato de amonio ( $1650 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido bórico ( $6.3 \text{ mg L}^{-1}$ ), Cloruro de calcio ( $440 \text{ mg L}^{-1}$ ), cloruro de cobalto ( $0.025 \text{ mg L}^{-1}$ ), sulfato cúprico ( $0.025 \text{ mg L}^{-1}$ ), sulfato ferroso ( $27.8 \text{ mg L}^{-1}$ ), sulfato de magnesio ( $370 \text{ mg L}^{-1}$ ), sulfato de manganeso ( $16.9 \text{ mg L}^{-1}$ ), ioduro de potasio ( $0.83 \text{ mg L}^{-1}$ ), nitrato de potasio ( $1900 \text{ mg L}^{-1}$ ), fosfato de potasio ( $170 \text{ mg L}^{-1}$ ), sal sódica de etilen dinitril tetracetato ( $37.3 \text{ mg L}^{-1}$ ), molibdato de sodio ( $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) y sulfato de zinc ( $8.6 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Merino M. E., 2014).

Las sales MS son las más utilizadas en la actualidad, y se han utilizado para propagar orquídeas, alcatraces, y también se han utilizado en pinos. Existen más mezclas de sales minerales como lo son:

Gamborg, Miller, & Ojeina (1968)

Knudson (1946)

Morel & Muller (1964)

Torrey (1964)

White (1963)

Litvay, Johnson, Verma, Einspahr, & Weyrauch (1981)

DCR (Gupta & Durzan, 1985)

HD (Gresshoff & Doy, 1972)

Pullman & Johnson (2002)

Woody plant (McCown & Lloyd, 1981)

Entre muchos otros y sus modificaciones.



## **Macronutrientes y micronutrientes**

Los macronutrientes se encuentran en grandes cantidades en la planta mientras que los micronutrientes se encuentran en pequeñas cantidades. Los macronutrientes son: carbono, calcio, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio. Y los micronutrientes son hierro, manganeso, boro, cobre, zinc, molibdeno y cloro. Tanto micronutrientes como macronutrientes son importantes y la ausencia de alguno anula el crecimiento. Las funciones que desempeñan dentro de la planta son muy diversas y numerosas y, su principal objetivo es acelerar y hacer posibles las relaciones químicas de la planta (Sánchez, 1984).

## **Reguladores de crecimiento**

Una fitohormona es un compuesto producido por las plantas cuyo principal efecto se lleva a cabo a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Los reguladores de crecimiento en cambio son compuestos sintetizados químicamente o, en ocasiones se obtienen de otros organismos y son mucho más potentes que las fitohormonas generalmente (Alcantara, Acero, Alcántara, & Sánchez, 2019).

Dentro de las principales funciones de los reguladores de crecimiento se encuentra el crecimiento y desarrollo de la planta, enraizamiento, producción del fruto, la floración, entre otras.

Se conocen 7 tipos de reguladores de crecimiento: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, inhibidores y poliaminas (Turrialba, 1987). A continuación, se describen de manera breve los tres principales promotores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

**Auxinas:** Las auxinas desempeñan un papel clave en la coordinación de muchos procesos de crecimiento y comportamiento durante el ciclo de vida de las plantas. En la actualidad se conocen tres auxinas naturales de las cuales destaca el ácido

indolacético (AIA) producido en hojas jóvenes, flores, frutos y granos de polen (Moreira, 2015).

Dentro de las principales funciones de las auxinas se encuentra que son las encargadas de promover la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis (Segretín, s.f).

Las auxinas conforman el grupo más utilizado para el crecimiento y desarrollo de la planta en el cultivo de tejidos vegetales, siendo estas los reguladores de crecimiento más utilizado en combinación con citocininas para promover la multiplicación de plantas *in vitro*.

Las auxinas más usadas son: ácido 3 indolbutírico (AIB), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4 amino 3,5,6 tricloropicolínico, ácido naftalenacético (ANA), ácido 3 indolacético (AIA).

**Citocininas:** Las citocininas son aquellas sustancias que pueden estimular principalmente la división celular, en la actualidad la citocininas más encontrada en plantas es la zeatina (Álvarez, 2014).

La biosíntesis de las citocininas ocurre a través de la modificación química de la adenina. Ésta modificación ocurre principalmente en las puntas de las raíces y durante el desarrollo de las semillas. El transporte de las citocininas es a través del xilema de la raíz a los brotes. Las principales funciones que tienen las citocininas son la división celular, morfogénesis (induce la formación de un nuevo brote), crecimiento de brotes axilares, elongación de hojas, retrasar la senescencia de la hoja, puede mejorar la apertura de los estomas en algunas especies y ayuda al desarrollo de los cloroplastos (Davies, 1987).

Las citocininas más utilizadas son: N<sup>6</sup> dimetil alil aminopurina (2iP), N<sup>6</sup> (4 hidroxil, 3 metil, 2, butenil) adenina (Zeatina), N<sup>6</sup> furfural amino purina (cinetina) y N<sup>6</sup>bencil amino purina (BA).

**Giberelinas:** La síntesis y presencia de altos contenidos de giberelina se encuentra en hojas y yemas en crecimiento activo, y en material adulto en los frutos, y en cantidades menores en las raíces. El fotoperiodo y la temperatura baja son condiciones para activar o inactivar las moléculas. Las funciones principales de las giberelinas son inducir el crecimiento en altura, promueve el desarrollo de inflorescencias y la floración, interrumpe el periodo de dormancia en semillas y promueve el desarrollo de muchos frutos (Jordán & Casaretto, 2006).

### **Vitaminas y materiales de soporte**

El principal material de soporte utilizado en los cultivos de tejidos vegetales es el agar, cuya función es mantener a la planta estática, ya que el movimiento constante la estresa. En algunos casos es necesario estresar a la planta para que esta active mecanismos de defensa y se pueda dar la callogénesis principalmente, esto con el objetivo de tener una masa amorfa para multiplicar especies a gran escala, pero esto va a depender del propósito de la investigación.

Distintos autores han investigado el efecto de la concentración y marca comercial del agar, así como, el comportamiento de las especies ante el tipo de agar y su concentración, pero no se encontró correlación alguna entre las características y el crecimiento de las plantas (Cañal, Rodríguez, Fernández, Sánchez, & Majada, 2001).

Por otro lado las vitaminas estimulan procesos de crecimiento específico, las más utilizadas son: ácido ascórbico, ácido fólico, ácido nicotínico y tiamina. En el cuadro 1 se muestran las vitaminas más usadas y el medio de cultivo con el que comúnmente se utilizan, así como, las cantidades utilizadas (mg L).

Tabla 1: Vitaminas más usadas en los medios de cultivo en mg L

<b>Compuesto</b>	<b>Constabel, 1958</b>	<b>Gamborg, 1963</b>	<b>Menderson, Durell y Bonner, 1952</b>	<b>Morel y Wetmer, 1952</b>	<b>Nickell y Maretaki, 1969</b>	<b>Paris y Dumamet, 1953</b>	<b>Reinert y White, 1956</b>	<b>White. 1963</b>
<b>Ácido p amino benzoico</b>		0.2	0.05					
<b>Ácido ascórbico</b>	10	0.4					0.1	
<b>Biotina</b>	0.1	0.00025	0.005	0.91	0.01	0.002	0.01	
<b>Cloruro de colina</b>	10	0.2	0.1				10	
<b>Cianocobalamina</b>							0.0015	
<b>Ácido fólico</b>	1	0.015	0.1			0.0003		
<b>Ácido nicotínico</b>	0.5	0.5	0.5	1	2.8	0.06	0.5	0.5
<b>Pantotenato de calcio</b>	10	0.4	0.8	1.0		5.0	0.1	
<b>Cloruro de piridoxina</b>		0.5	0.1	1	0.2	0.001	0.1	0.1
<b>Riboflavina</b>	0.1	0.015	0.05		0.2	0.001	0.1	
<b>Cloruro de tiamina</b>	0.1	0.5	0.1	1	0.03	0.005	0.1	0.1

Fuente: (Merino M. E., 2014)

#### **2.1.4 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es el proceso por el cual las células del explante cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales. Generalmente este proceso se lleva a cabo en presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, principalmente auxinas y citocininas, pero si el explante es inmaduro también se puede llevar a cabo este proceso sin la presencia de reguladores de crecimiento. En la mayoría de las especies la embriogénesis somática se da a partir de embriones cigóticos inmaduros, lo que es típico en coníferas (Celestino, Hernández, Carneros, López, & Toribio, 2005).

Los objetivos principales de la embriogénesis somática en especies forestales son: recuperación de individuos principalmente, además de contribuir en gran medida a la mejora en la producción de individuos transgénicos, que por ende ayuda a la silvicultura clonal para tener una alta productividad, además de ayudar a tener madera de mejor calidad y que, plagas y enfermedades tengan un menor impacto en dichas plantaciones.

Además también dicha técnica se ocupa para la producción de metabolitos secundarios en especies de interés, así como, la creación de semillas sintéticas. Y de esa manera se asegura material genético y, se preserva éste con la ayuda de técnicas como la crioconservación.

Los explantes que se utilizan con mayor frecuencia en la embriogénesis somática son: embriones, cotiledones, hojas, tallos, ápices, esporas y callos. También es importante mencionar que existen dos tipos de embriogénesis somática: la directa que es aquella por la que el tejido inicial utilizado no pasa por etapa de callo, y la indirecta, que es por la cual el tejido inicial forma una masa de células no diferenciadas llamada callo, el cual posteriormente formará estructuras diferenciadas con ayuda de reguladores de crecimiento.

El proceso de embriogénesis somática consta de las siguientes etapas:

**Iniciación del tejido embriogénico:** se lleva a cabo el proceso de selección del explante madre, es decir aquel que tenga las mejores características de acuerdo a lo que se esté buscando hacer. También se lleva a cabo el proceso de esterilización para disminuir y/o eliminar la contaminación externa de material inicial a trabajar. Existen ocasiones donde el material inicial proviene de trabajos previos realizados, como es el caso en el cual se ocupan callos como explante inicial, en los cuales ya no será necesaria la fase de esterilización, aunque existen excepciones.

**Iniciación y establecimiento del tejido embriogénico:** la iniciación empieza cuando se forman los embriones somáticos, los cuales poseen las mismas características que el embrión cigótico. La maduración se refiere al desarrollo completo de dicho embrión hasta que pueda ser separado del material inicial y se pase a la fase de germinación (Freire, 2003).

**Germinación del embrión somático:** es en esta etapa cuando el embrión se cambia de medio de cultivo, puede ser sembrado junto con otros embriones o solo, en completa obscuridad, en penumbra o a luz directa, según los objetivos de la investigación. En esta etapa también deberían desarrollarse los cotiledones, la raíz y el ápice, es decir, lo más óptimo es obtener una planta completa para que pase a la siguiente etapa. En algunos casos esto no sucede, por lo que se buscan alternativas ex vitro.

**Aclimatación de la planta:** es cuando la planta es llevada del laboratorio a una zona (vivero comúnmente) con condiciones controladas, las cuales irán cambiando de acuerdo a las necesidades de aclimatación de la planta para asegurar su supervivencia en campo.

**Instalación en campo:** es la etapa final del proceso de embriogénesis somática en la cual los clones y/o individuos mejorados se establecerán en campo abierto, para estudiar su comportamiento en un medio natural, y así, evaluar la respuesta de estos a factores bióticos y abióticos, y corroborar si cumplen con los objetivos esperados.

### 2.1.5 Meta análisis

El meta análisis es un estudio que tiene como propósito reunir resultados de estudios empíricos para determinar el estado del arte de un tema en particular, por tanto se lleva a cabo como una investigación empírica. El meta análisis consta de seis etapas, las cuales son: 1) la formulación del problema, 2) definir los criterios de inclusión y búsqueda de los estudios, 3) codificar las características de los estudios que puedan ajustar los resultados, 4) calcular el tamaño del efecto, 5) técnicas de análisis estadístico e interpretación de resultados y 6) la publicación del meta análisis (Sanchez, 2010).

A continuación, se describen brevemente las etapas de un meta análisis:

**Formulación del problema:** en esta etapa el investigador define cual es el problema a resolver con su investigación, define sus objetivos, hace sus hipótesis e incluso se plantea las preguntas de investigación a resolver.

**Definir los criterios de inclusión y búsqueda de los estudios:** aquí el investigador se plantea qué criterios se quieren conocer de los estudios empíricos, es decir, las variables que serán usadas para hacer el meta análisis, por ejemplo, en el presente trabajo algunos de los criterios de búsqueda fueron: qué el estudio empírico incluyera los procesos de embriogénesis somática, el medio de cultivo usado, reguladores de crecimiento, tipo de explante, entre otro.

**Codificar las características de los estudios que puedan ajustar los resultados:** es aquí donde se crea una base de datos la cual incluirá todas las variables elegidas con sus respectivos valores, de ser necesario se incluirán algunas claves de dichas variables, las cuales serán evaluadas por el software donde se realiza el meta análisis, ésta puede ser en el formato que el investigador decida, por ejemplo Excel, R, etc., de preferencia un formato que pueda ser exportado fácilmente al programa estadístico en el cual se va a trabajar el meta análisis.

**Calculo del tamaño del efecto:** el tamaño del efecto es una medida que cuantifica dos objetos, y captura tanto la dirección como la magnitud de esa relación, si ésta se manifiesta con el mismo tamaño del efecto, entonces son comparables, en otras palabras, el tamaño del efecto es el efecto de un tratamiento y que tan grande es ese efecto; la medida del tamaño del efecto debe ser comparable, confiable, contable e interpretable (Harrer, Cuijpers, Furukawa, & Ebert, 2021). En esta etapa se hacen los primeros cálculos estadísticos.

**Técnicas de análisis estadístico e interpretación de resultados:** es aquí donde se realizan todos los análisis estadísticos y, también todas las transformaciones de datos necesarias para posteriormente analizar los resultados de los mismos, incluyendo los gráficos forest.

**Publicación del meta análisis:** es la etapa final y es donde se envía el artículo del meta análisis realizado a una revista científica para su publicación, como cualquier investigación empírica.

A pesar de que el meta análisis es usado en su mayoría por investigadores en las áreas de medicina y psicología, provee una gran ayuda para otras áreas al ser un estudio que puede usarse de forma generalizada para adaptarse a diferentes campos de la investigación. Además provee al investigador que lo realiza de un vasto número de estudios empíricos que enriquece su conocimiento teórico, y que coadyuva a la interpretación final de los resultados estadísticos que brinda un meta análisis para que ésta sea de una mejor calidad.

Uno de los principales huecos que se llenan con un meta análisis es el desfase que ocurre en la práctica profesional en determinado momento y los avances que ha alcanzado la investigación hasta ese momento (Sanchez - Meca & Botella, 2010). Además de ser una herramienta de fácil acceso para aquellos nuevos investigadores interesados en el tema, así como, aquellos investigadores en otras áreas que pueden tener la necesidad de conocer de una manera resumida los avances y/o mejores procesos para llevar a cabo dicha investigación experimental.



Un meta análisis debe llevarse a cabo con el mismo rigor científico que una investigación empírica, por lo cual es de suma importancia que un meta análisis pueda ser replicable, objetivo y sistematizado (Rubio - Aparicio, Sánchez - Meca, Marín - Martínez, & López- López, 2018).

### **Meta análisis de proporciones**

Como se mencionó el meta análisis puede generalizarse a diversas áreas de estudio, así como, ocupar métodos estadísticos que permitan la correcta interpretación de los resultados, tal es el caso de los meta análisis de proporciones.

De acuerdo a Naike (2018) “el meta análisis de proporciones sintetiza una medida unidimensional binomial conocida como proporción promedio, la cual es un promedio del resultado de múltiples estudios ponderados por la inversa de su varianza de muestreo usando cualquiera de los modelos: modelo de efectos fijos o modelo de efectos aleatorios”.

Lipsey & Wilson (2001) mencionan que “las proporciones son definidas como el número de casos de interés en una muestra con características particulares, dividida por el número de muestra”.

Además Borestein, Hedges, Higgins, & Rothstein (2009) comentan que la mayoría de los meta análisis se enfocan en los tamaños del efecto, los cuales son indicativos de una relación entre un grupo control y un grupo de tratamientos, mientras que los meta análisis de proporciones tienen el objetivo de obtener un estimado más preciso de la proporción global de cierto caso o evento. En éste tipo de meta análisis cada estudio aporta una serie de éxitos y un tamaño de muestra (Hamza, van Houwelingen, & Stijnen, 2008).

Para el caso particular de éste estudio se usaron como proporciones el número de explantes iniciales y el número de explantes finales de cada estudio.

## **2.2 MARCO DE REFERENCIA**

En este apartado se menciona la técnica de embriogénesis somática usada como método para conservación, recuperación y manejo de recursos forestales. Así como, se mencionan algunos estudios relacionados con el presente trabajo, que se han llevado a cabo en el área de la agricultura utilizando el método de meta-análisis.

### **2.2.1 La biotecnología en los recursos forestales**

Las técnicas de biotecnología recientes aplicadas a la conservación de plantas tienen un gran potencial. Éstas han proporcionado nuevos enfoques para superar problemas como condiciones ambientales difíciles, estrés biótico, plagas y enfermedades, permitiendo plantas con una combinación de genes única, resistentes a plagas. Además durante los últimos 15 años las técnicas de cultivo *in vitro* han sido desarrolladas para más de 1000 especies de plantas (Villalobos & Engelmann, 1995).

Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática son alternativas novedosas de propagación de especies, además de ayudar a contribuir con la conservación de las especies y el mejoramiento genético. Además de permitir la producción de un buen número de plantas en periodos relativamente cortos. De ésta manera la micropropagación contribuye a mantener el equilibrio en los ecosistemas forestales ya que como herramienta de rescate permite la producción de plantas y la conservación de la diversidad genética, así como, la innovación de procedimientos tecnológicos en los bosques (Jiménez & Agramonte, 2013).

Aunque han sido numerosas las especies de coníferas que se han transformado genéticamente, el género *Pinus* resulta difícil de transformar y de micropropagar. Dentro de los principales obstáculos que presenta se encuentra la selección de líneas transgénicas y el establecimiento de cultivo embriogénico. Es por ello que

la embriogénesis somática resulta imprescindible en estudios de transformación genética y genómica funcional a fin de validar genes relacionados con procesos concretos. En la actualidad no se cuenta con un protocolo de embriogénesis somática estandarizado para aplicarlo a especies leñosas si no que es necesario adaptarlo a cada una de las especies (Pascual, Llebres, Cañas, & De la Torre, 2016).

### **2.2.2 Estudios realizados con los procesos de embriogénesis somática en México**

Desde hace algunos años se han realizado estudios relacionados al cultivo *in vitro* en pinos. Ojeda (1996), realizó un estudio donde evaluó la respuesta en la inducción de organogénesis y embriogénesis somática en *Pinus cembroides* (Zucc.) y *Pinus halapensis* (Mill.), en donde confirma que los requerimientos para inducir callos debe ser personalizado de acuerdo a la especie, pues ambas especies crecen en condiciones diferentes y por ende, las condiciones *in vitro* tienen que ser diferentes de acuerdo a las necesidades fisiológicas de las especies. De acuerdo a este estudio parece que la técnica de organogénesis resulta más eficiente para la regeneración *in vitro*, además *Pinus cembroides* presenta mejores respuesta para cultivo *in vitro*.

Un estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pino realizado por Rebolledo, Aparicio, & Cruz (2006) se enfocó en comparar el efecto de dos métodos de desinfección para los explantes de *Pinus pseudoestrobis* Lindl. y *Pinus jaliscana* Pérez de la Rosa, los resultados obtenidos fueron nuevamente muy distintos de acuerdo a la especie. A pesar de ello se estandariza el proceso de desinfección con alcohol al 50% por 30 segundos, seguido de la aplicación de hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos, al parecer resulta óptimo para ambas especies, aunque es importante mejorar los procedimientos para cada especie.

Robledo, Villalobos, & Santacruz (2009) realizaron un estudio de cultivo *in vitro* en un pino piñonero de gran importancia para el país, esta especie es el famoso

*Pinus maximartinezii* Rzed., endémico de México, que se encuentra en peligro de extinción, lo cual nos da un panorama amplio de cómo utilizar las técnicas de biotecnología para la recuperación, preservación y manejo adecuado de las especies. En dicho estudio se encontró que el uso de cotiledones como explante supera significativamente la respuesta obtenida con embriones. También mencionan que los brotes adventicios obtenidos en este estudio forman raíces dando lugar a nuevas plantas, aunque esto se da en bajas proporciones.

Finalmente otro estudio de variación y vigor de semillas de *Pinus cembroides* y *Pinus cembroides subsp orizabensis* D. K. Bailey realizado por Hernández, López, Ramírez, & Romero (2018) en el cual mencionan que *Pinus cembroides* tiene una testa más gruesa, una tasa de absorción de agua menor, pero una capacidad más alta de germinación que *Pinus cembroides subsp orizabensis*, lo cual confirma diferencias morfológicas y potencialmente adaptativas. Además mencionan que la procedencia de la semillas tiene un efecto significativo en la calidad de éstas. El color de la testa de las semillas influencia las variables de germinación, semillas con testa café tienen mayor capacidad germinativa que las semillas con testa negra. Ésta última es más vigorosa y germina más rápido.

### **2.2.3 Algunos estudios realizados con los procesos de embriogénesis somática en el mundo**

Recientemente algunos investigadores han notado la importancia del estudio a nivel químico y genético de especies de interés, de acuerdo al lugar donde estos se encuentran, y es por ello que algunos se han dado a la tarea de hacer estudios de cultivo *in vitro*, embriogénesis y organogénesis somática en especies forestales de interés, nativas y/o endémicas del país donde residen.

A continuación se mencionaran estudios realizados en diferentes partes del mundo, así como, estudios que van más allá de la embriogénesis somática, es decir, estudios que incluso han alcanzado niveles tales a la ingeniería genética creando híbridos de pinos y, que utilizaron la embriogénesis somática como primer paso a dichos desarrollos.

Salaj, Fráterová, Cárach, & Salaj (2014) en su estudio tenían como objetivo evaluar el efecto de la preparación del medio de cultivo en los procesos de embriogénesis somática en *Pinus nigra* Arn., pues como ellos mencionan, en estudios realizados previos al suyo, ya se había encontrado que el tipo de medio y los reguladores de crecimiento, así como, las concentraciones de éstos son de gran importancia en las respuestas finales obtenidas.

Igualmente, notaron que durante la etapa de maduración de los embriones somáticos, ocurre un cambio dentro de la organización interna, de los cuales los principales son: la diferenciación del meristemo de la raíz en los embriones somáticos precotiledonares y, la formación de hebras prevasculares en embriones somáticos cotiledonares. Además de notar que la maduración de los embriones como la germinación de éstos, dependen de su línea celular y de la composición de las sales del medio.

Otro estudio realizado por García - Mendiguren, Montalbán, Goicoa, Ugarte, & Moncaleán (2015) que tenía por objetivo evaluar como afectan las condiciones del ambiente en la producción de embriones somáticos en las etapas iniciales de la embriogénesis somática en *Pinus radiata* D. Don., encontraron que como se menciona en la literatura, uno de los aspectos más influyente en la embriogénesis somática son los reactivos utilizados (medios de cultivo, reguladores de crecimiento y, agentes gelificantes). Pero ellos en su estudio además de evaluar aspectos químicos también evaluaron aspectos físicos como la temperatura y la disponibilidad de agua, para identificar si son importantes en la etapa inicial o en la etapa de proliferación.

Encontraron que en las etapas de iniciación a diferentes temperaturas afecta las etapas siguientes de la embriogénesis somática, por tanto los tejidos embriogénicos si son influenciados por las condiciones del ambiente a los que sean expuestos. Sus resultados siguieron que la exposición a diferentes condiciones ambientales no fue suficiente para adquirir los mecanismos de adaptación. Por tanto la manipulación de las condiciones ambientales en la etapa inicial es viable cuando se quiere modular la etapa de proliferación y maduración.

Este trabajo nos muestra una vez más la importancia de conocer los requerimientos de nutrición de la planta, así como los requerimientos ambientales, para poder tener una embriogénesis somática exitosa de la especie a propagar.

El trabajo realizado por González (2018) propuso mejorar varios protocolos de embriogénesis somática realizados en *Pinus pinea* L., que es una especie de importancia económica por su semilla que es comestible. A pesar de que ocuparon semilla proveniente de condiciones diferentes de cultivo, no se logro mejorar la inducción descrita en los trabajos propuestos a mejorar, por tanto confirmaron que ésta especie es recalcitrante a la respuesta embriogénica. Aunque si obtuvieron una ligera mejora en cuanto a la producción de embriones en medios suplementados con algunos carbohidratos.

Otros resultados obtenidos fueron que a mayor temperatura a partir de la fase de proliferación a la etapa de maduración, se estimula la maduración y, también notaron que a menor disponibilidad hídrica menor número de embriones. Lo cual confirma una vez más que las condiciones ambientales son de gran importancia en la embriogénesis somática.

También un estudio realizado por Gao, Peng, Wang, Shen, & Yang (2020), en el cual evaluaron las condiciones de cultivo para la inducción y proliferación de callo por embriogénesis somática en *Pinus koraiensis*, una especie de importancia económica por sus aceites, piñones, y su madera de alta calidad.

Notaron que para esta especie existen problemas al inducir callo si usan como explante inicial embriones inmaduros, entre ellos está la baja eficiencia de proliferación, baja embriogenicidad y poco vigor, por lo tanto las mejores condiciones para proliferación y cultivo de embriones inmaduros de *P. koraiensis* aún no son muy claras. A pesar de que, se usaron diferentes combinaciones de auxinas, citocininas y agar y, probar el subcultivo cada 13 – 15 días. Es por esto que su estudio servirá como la base para el establecimiento de sistemas a gran escala para embriogénesis somática y propagación de *P. koraiensis*.

Finalmente en la investigación hecha por Montalbán, et al. (2020), la cual tenía como propósito evaluar y modificar los protocolos que existen de embriogénesis somática en *Pinus radiata*, para producir plantas de pino híbrido (*Pinus radiata* x *Pinus attenuata*) para posteriores pruebas de campo.

Ellos analizaron la tasa de maduración, el número de embriones somáticos, la tasa de germinación y el crecimiento ex vitro en líneas celulares derivadas de diferentes tratamientos de iniciación, especies de árboles madre y cruza.

Los principales resultados obtenidos no encontraron diferencias en la maduración y germinación *in vitro*, sin embargo, se encontraron diferencias importantes en cuanto al crecimiento de las especies de árboles madre en relación al crecimiento ex vitro, siendo mayores en donde *P. radiata* actuaba como madre, además las líneas celulares de este híbrido fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y regeneradas después de 1 y 5 años.

Los autores de ésta investigación sugieren seguir haciendo investigación respecto a las condiciones ambientales en la etapa de iniciación de la embriogénesis somática para saber si ésta inhibe o mejora el proceso. También sugieren estudiar los efectos de árboles madre, ya sea *P. radiata* o *P. attenuata* como árbol madre, en la conversión de masas embrionales para plantas somáticas. Es importante mencionar que, algunos de los autores de éste trabajo han evaluado en *P. radiata* los aspectos ambientales en los procesos de iniciación de material embriogénico en embriones inmaduros. Por tanto, se recomienda considerar aplicar sus sugerencias en otras especies de pinos para mejorar los futuros protocolos.

Hasta el momento *P. radiata* es la especie con la que más se ha trabajado el método de embriogénesis somática, es por esto que los protocolos usados en dicha especie son los más usados para replicarse en otras. Por otro lado los híbridos de pinos ofrecen una mejor calidad de madera, una mayor resistencia a los daños ocasionados por sequías y heladas, mejor adaptación a alturas mayores y mejores rendimientos, es por esto que el método de embriogénesis

somática ofrece grandes posibilidades para obtener mayor cantidad de plantas para reforestaciones, y así, satisfacer las demandas de la sociedad.

A nivel mundial ya se están trabajando protocolos con especies mejoradas e incluso se están evaluando aspectos ambientales como la temperatura, la disponibilidad de agua, la exposición a la luz, que no habían sido considerados para un proceso exitoso de embriogénesis somática en pinos. Por lo tanto, es importante seguir avanzando en la investigación apoyándose de esos protocolos en las especies de pinos mexicanos para así asegurar la conservación de especies endémicas del país, aumentar la disponibilidad de individuos de especies de importancia económica y, aumentar las variedades genéticas existentes para futuras investigaciones en campo.

#### **2.2.4 El Meta-análisis en la Agricultura**

Como se pudo observar en los estudios mencionados anteriormente es de gran importancia conocer los reguladores de crecimiento más usados, los mejores métodos de desinfección, la temperatura, si los explantes fueron sometidos o no a periodos de obscuridad durante la germinación, a qué pH fueron ajustados los medios de cultivo, qué medios de cultivo se utilizaron e incluso en algunos casos, es de suma importancia conocer las marcas de los reactivos utilizados en los estudios.

A continuación, se mencionaran algunos estudios realizados en el área de agricultura que han utilizado el método de meta análisis para así, mejorar las decisiones a tomar en una investigación experimental que se lleve a cabo más adelante.

En un estudio realizado por López - Herrera, WingChing - Jones, & Rojas – Bourrillón ( 2014), se estudió el uso potencial de los subproductos del cultivo de la piña (*Ananas comosus*) para usarla dentro de la dieta de animales rumiantes. Las variables utilizadas para realizar este meta análisis fueron el proceso de



ensilaje, el secado o el material fresco sin ningún tipo de aditivo. Para este estudio se utilizó la planta completa.

Se obtuvieron como resultados que la composición nutrimental de los materiales varía de acuerdo a la parte de la planta utilizada. Por ejemplo la raíz es la parte de la planta que tiene mayor materia seca, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina y cenizas. A diferencia de la corona y restrosos que tienen mayores contenidos de proteína cruda, energía, y un menor contenido de materia seca.

También encontraron una diferencia en los procesos de deshidratado, el material seco y el ensilado, pero no se encontró diferencia en los materiales con alto contenido de humedad. Finalmente con este estudio demostraron que los subproductos de los cultivos de piña son aptos para incluirlos como parte de la ración en la alimentación de los animales rumiantes sin afectar su desempeño productivo.

En otra investigación realizada por Butarelli, Díaz, Ghiglione, & Poncio (2019), se evaluaron mediante una revisión sistemática y un meta análisis los efectos de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento en trigo. Definiendo al rendimiento como el resultado de la interacción entre factores ambientales, genéticos, tecnológicos y de manejo. Mencionan que la fertilización nitrogenada constituye una de las limitantes principales en los rendimientos de los cultivos de trigo en Argentina, país en el cual fue realizado el estudio.

La nutrición mineral es una limitante en la producción de trigo en Argentina. Como parte de la nutrición mineral, la deficiencia de nitrógeno tiene como consecuencia la reducción en la expansión foliar, senescencia prematura, además de afectar la tasa fotosintética. Todo lo anterior dando como consecuencia menor materia seca y grano.

Existe una gran cantidad de información disponible del tema, por tanto ellos evaluaron 16 artículos de investigación. De acuerdo al meta análisis realizado se

encontró que la fertilización nitrogenada aumenta los rendimientos de trigo en un 37, 74 y 102% para dosis bajas, medias y altas respectivamente, en comparación al testigo. A pesar de esto ellos recomiendan evaluar otras variables, no solo el rendimiento, para observar si existen diferencias que influyan más en dichos rendimientos

En una investigación realizada por Rodríguez, Bordas, Piñeiro, García de Castro, & Méndez (2013) mediante un meta análisis, buscaban conocer los efectos de retirar la madera quemada sobre la regeneración de los bosques mediterráneos, ellos evaluaron las variables altura, densidad y mortalidad de la regeneración después de retirar la madera de un incendio, en su mayoría fueron bosques de pino, principalmente de *Pinus pinaster*. Con la iniciativa basada en la evidencia propuesta por la Universidad de Bangor en Reino Unido, se realizó este trabajo para tener evidencia científica de si realmente afecta o no retirar el material afectado durante un incendio.

Como resultado el tamaño del efecto no fue significativo para ninguna de las variables, por tanto, la evidencia incluida en los estudios dentro del meta análisis realizado, la extracción del material quemado no mejora la capacidad de regeneración del bosque después de un incendio, si no que la dificulta o no hay ninguna ventaja. Los autores mencionan que el tamaño de muestra de el meta análisis no fue suficiente para tener evidencia clara, por lo que sugieren recabar evidencia más firme y, no solo basarse en la experiencia personal de los encargados de dicha práctica de gestión forestal.

Otro estudio realizado en el género *Pinus* usando la metodología del meta análisis fue el realizado por Kitikidou, Milios, & Katsogridakis (2017), en el cual su objetivo fue realizar una revisión sistemática para la estimación de volumen de *Pinus sylvestris* en Europa y, conocer como la diferencia de latitud y el clima causarían o no una diferencia en la productividad.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que una investigación en Italia seria mejor, mientras que en Grecia la especie tiene mayores volúmenes

en comparación con los de Suecia. Sugieren realizar una investigación con un tamaño de muestra mayor en Grecia. Además proponen realizar un meta análisis usando el tamaño del efecto en una metaregresión y el meta análisis de varianza.

Para concluir éste apartado citamos el estudio de Soltani, Baskin, Baskin, & Benakashani (2020) porque es el estudio que usando la metodología del meta análisis se asemeja al presente trabajo, aunque existen muchas diferencias, la semejanza fijada se refiere al trabajo en laboratorio y al uso de semillas como material inicial, principalmente. En el citado trabajo se tenía como objetivo evaluar mediante un meta análisis los métodos utilizados para romper con la dormancia de las semillas del mega género *Astragalus* (*Fabaceae*).

Los estudios evaluados fueron aquellos que cumplieran con comparar la germinación de la semilla después del tratamiento usado para romper la dormancia con el control. Los tratamientos evaluados para romper con la dormancia de la semilla fueron: inmersión en ácido sulfúrico, congelación en seco, congelación en húmedo, almacenamiento en seco, calor y frío, calor seco, calor húmedo, pre enfriamiento, métodos mecánicos, calor seco más calor húmedo, ácido giberélico, y humo.

Se obtuvo como resultado que los mejores tratamientos para romper con la dormancia en semillas de *Astragalus* fueron los métodos mecánicos y químicos (ácido sulfúrico). Mientras que el pre enfriamiento, el ácido giberélico y el humo no son efectivos. Esto confirma que las semillas de las especies evaluadas (40 en total), tienen una dormancia física. Este estudio puede ser de gran utilidad para científicos que quieran germinar semillas de *Astragalus*.

Como se observó en los trabajos mencionados este tipo de investigaciones usando el meta análisis como herramienta de evaluación previa a una investigación experimental, permite tomar decisiones importantes en las diferentes áreas, a pesar de ser un método relativamente nuevo usado en el área de la agricultura, empieza a notarse su importancia a la hora de la toma de decisiones en investigaciones empíricas. Es por ello que el meta análisis debe ser

considerado en el área experimental como una ayuda en los procesos que ocurren dentro de un laboratorio como es el caso de la embriogénesis somática.

## LITERATURA CITADA

- Alcantara, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D., & Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Scielo*, 109-129.
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (2011). How to obtain the p value from a confidence interval. 343. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.d2304>
- Álvarez, A. B. (2014). Reguladores del crecimiento vegetal. En D. V. Hurtado, & M. E. Merino, *Cultivo de tejidos vegetales* (págs. 48-66). México: Trillas.
- Baujat, B., Mahé, C., Pignon, J. P., & Hill, C. (2002). A graphical method for exploring heterogeneity in metaanalises: application to a meta-analysis of 64 trials. *Statistics in Medicine*, 21(18), 2641-2652. doi: <https://doi.org/10.1002/sim.1221>
- Borestein, M., Hedges, L., Higgins, J., & Rothstein, H. (2009). *Introduction to Meta Analysis*. John Wiley & Sons,. doi:10.1002/9780470743386
- Butarelli, F., Díaz, P. R., Ghiglione, M., & Poncio, J. (Mayo de 2019). Revisión sistemática y meta análisis: efectos de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento en trigo. Córdoba, España. Recuperado el 25 de Marzo de 2021
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 3-9.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López, D., & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria*, 345-357.
- CONAFOR. (s.f.). *Pinus cembroides* Zucc. Ciudad de México, México.
- Davies, P. J. (1987). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. New York: Kluwer Academic Publishers.
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195-209. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html>

- Gamborg, U. L., Miller, R. A., & Ojeina, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*, 50, 151-158.
- Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H., & Yang, L. (2020). Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Springer*, 32, 483-491. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01147-1>
- García - Mendiguren, O., Montalbán, I. A., Goicoa, T., Ugarte, M. D., & Moncaleán, P. (2015). Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Springer*, 30, 949-958. doi:10.1007/s00468-015-1336-7
- González, N. (2018). Mejora de protocolos de regeneración por embriogénesis somática en pino piñonero. *Tesis doctoral*. Madrid, España.
- Gresshoff, P. M., & Doy, C. H. (1972). Development and differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta*, 107(2), 161-170. doi: <http://www.jstor.org/stable/23369977>
- Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cells Report*, 4, 177-179. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00269282>
- Hamza, T., van Houwelingen, H., & Stijnen, T. (2008). The binomial distribution of meta-analysis was preferred to model within-study variability. *Journal of clinical epidemiology*, 61(1), 41-51. doi:10.1016 / j.jclinepi.2007.03.016
- Harrer, M., Cuijpers, P., Furukawa, T. T., & Ebert, D. D. (2021). *Doing Meta-analysis with R: A Hands-on Guide*. Boca Raton, FL and London: Chapman & Hall CRC.
- Hernández, L. A., López, J., Ramírez, C., & Romero, A. (20018). Variación y vigor en semillas de *Pinus cembroides* y *Pinus orizabensis*. *Agrociencia.*, 1162-1178.
- Higgins, J., & Thomas, J. (2021). 7.7.3.2 *Obtaining standard deviations from standard errors and confidence intervals for group means*. Obtenido de Cochrane Training: [https://handbook-5-1.cochrane.org/chapter\\_7/7\\_7\\_3\\_2\\_obtaining\\_standard\\_deviations\\_from\\_standard\\_errors\\_and.htm](https://handbook-5-1.cochrane.org/chapter_7/7_7_3_2_obtaining_standard_deviations_from_standard_errors_and.htm)
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012 a). Plant Tissue Culture: current status and opportunities. En *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (págs. 1-28). Lahore, Pakistán: INTECH. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.5772/50568>

- Jiménez, F., & Agramonte, D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Bioteología vegetal*, 13(1), 3-21.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En F. A. Squeo, & L. Cardemil, *Fisiología vegetal* (págs. 12-18). Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
- Kelly, L. (2020). Practice 9 Calculating confidence intervals in R. En L. Kelly, *R practices for learning statistics*. Obtenido de [https://bookdown.org/logan\\_kelly/r\\_practice/p01.html](https://bookdown.org/logan_kelly/r_practice/p01.html)
- Kitikidou, K., Milios, E., & Katsogridakis, S. (2017). Meta-analysis for the volume of *Pinus sylvestris* in Europe. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 23(1), 23-34. doi: 10.5154/r.rchscfa.2015.11.052
- Knudson, L. (1946). *A new nutrient solution for the germination of orchid seeds*. Amer. Orch. Soc.
- Krikorian, A. D. (s.f). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En C. d. agricultura, *Krikorian, A, D.* (págs. 41-59). New York: SUNY.
- Lipsey, M., & Wilson, D. (2001). *Practical Meta-Analysis*. California, Estados Unidos: IDOSTATISTICS.
- Litvay, J., Johnson, M. A., Verma, D., Einspahr, D., & Weyrauch, K. (1981). *Institute of Paper Chemistry Technical Paper Series*. Wisconsin.
- López - Herrera, M., WingChing - Jones, R., & Rojas - Bourrillón, A. (2014). Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*) para la alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 383-392. doi:<https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15453>
- Manzanilla - Quiñones, U., Aguirre - Calderón, O. A., & Jiménez - Pérez, J. (09 de Agosto de 2018). ¿Qué es una conífera y cuántas especies existen en el mundo y en México? (R. Duno de Estefano, & L. L. Can Itza, Edits.) *CICY*, 10, 168-175. Recuperado el 2021
- McCown, B. H., & Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM) - A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16, 453-453.
- Merino, M. E. (2014). Medio de cultivo. En D. V. Hurtado, & M. E. Merino, *Cultivo de tejidos vegetales* (págs. 67-85). México: Trillas.

- Merino, M. E. (2014). Técnicas de esterilización y manipulación asépticas. En D. Hurtado, & M. Merino, *Cultivo de tejidos vegetales* (págs. 44-47). México: Trillas.
- Montalbán, I., Castander - Olarieta, A., Hargreaves, C., Gough, K., Reeves, C., van Ballekom, S., . . . Moncaleán, P. (2020). Hybrid Pine (*Pinus attenuata* x *Pinus radiata*) somatic embryogenesis: What do you prefer, mother or nurse? *Forest*. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/f12010045>
- Moreira, C. (2015). Auxinas. *Ciencia elemental*, 3(4), 204. doi:<http://doi.org/10.24927/rce2015.204>
- Morel, G., & Muller, J. F. (1964). The culture *in vitro* of apical meristem of potato. 258, 5250-5252.
- Naike, M. A. (2018). *Research Gate*. doi:10.13140
- Ojeda, M. C. (Septiembre de 1996). Inducción de organogénesis y embriogénesis somática en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halapensis* (Mill). Tesis. Marín, Nuevo León, México.
- Pargas, R., Murillo, B., & Ruíz, F. H. (2014). La biotecnología y el mejoramiento genético de plantas. En *Genética general* (págs. 75-98). México: Trillas.
- Pascual, M. B., Llebres, M. T., Cañas, R., & De la Torre, F. (2016). Mejora de especies forestales mediante transformación genética. *Encuentros en la biología*, 9(161), 192-194.
- Pullman, G. S., & Johnson, S. (2002). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Ann. For. Sci*, 59, 663-668.
- Rebolledo, V., Aparicio, A., & Cruz, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación de dos especies de pinos. *Forestal Veracruzana*, 8(2), 27-32.
- Rebolledo, V., Aparicio, A., & Cruz, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana*, 8(2), 27-32.
- Robledo, A., Villalobos, V. M., & Santacruz, A. (2009). Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Acta Botánica Mexicana*, 47-62.
- Rodríguez, M. N., Bordas, P., Piñeiro, J., García de castro, N., Martín, P., & Méndez, M. (2013). Meta-análisis de los efectos de la retirada de la madera quemada sobre la regeneración de los bosques mediterráneos:

- un paso hacia una gestión basada en la evidencia. *Ecosistemas*, 22(1), 71-76. doi:10.7818/ECOS.2013.22-1.15
- Rubio - Aparicio, M., Sánchez - Meca, J., Marín - Martínez, F., & López- López, J. A. (2018). Recomendaciones para el reporte de revisiones sistemáticas y meta análisis. *Anales de psicología*, 34(2), 412-420. doi:10.6018
- Salaj, T., Fráterová, L., Cárach, M., & Salaj, J. (2014). The effect of culture medium formulation on *Pinus nigra* somatic embryogenesis. *Dendrobiology*, 71, 119-128. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.071.012>
- Sanchez - Meca, J., & Botella, J. (2010). Revisiones sistemáticas y meta análisis: herramientas para la práctica profesional. *Papeles de psicólogo*, 3(1), 7-17.
- Sanchez, J. (2010). Cómo realizar una revisión sistemática y un meta análisis. *Aula Abierta*, 38(2), 53-64.
- Sánchez, L. (1984). La alimentación mineral de las plantas. *Temas de divulgación*. Salamanca, España: I.O.A.T.O.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 107-120.
- Sanchez-Meca, J. (2010). Cómo realizar una revisión sistemática y un meta-análisis. *Aula abierta*, 38(2), 53-64. Recuperado el 2021
- Segretín, M. E. (s.f.). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*, 1-6.
- Soltani, E., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Benakashani, F. (2020). A meta-analysis of the effects of treatments used to break dormancy in seeds of the megagenus *Astragalus* (*Fabaceae*). *Seed science research*, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1017/>
- Torrey, J. G. (1964). *Memoirs of the Torrey Botanical Club* (Vol. 21). Torrey Botanical Society.
- Turrialba, C. (1987). *Memoria II curso de cultivo de tejidos*. Costa Rica: IICA.
- Villalobos, V. M., & Engelmann, F. (1995). Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. *Microbiology and biotechnology*, 11, 375-382.
- White, P. R. (1963). *The cultivation of animal and plant cells* (Segunda ed.). New York: Ronald Press.



### 3. META ANÁLISIS DE PROPORCIONES DE LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *PINUS L.*

#### META ANALISYS OF PROPORTIONS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS PROCESSES IN THE GENUS *Pinus L.*

R. Hernández-Hernández<sup>1</sup>

A. Ávalos-Vargas<sup>1</sup>

J.L. Rodríguez de la O<sup>1</sup>

R.L. Granados-Victoriono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5 C.P 56220, Texcoco, México.

Autor de correspondencia: José Luis Rodríguez de la O. Correo electrónico: [jirdelao@gmail.com](mailto:jirdelao@gmail.com)

#### RESUMEN:

El género *Pinus L.* se destaca por su importancia ecológica, económica y cultural, ya que de él derivan muchos bienes y servicios que aprovecha el ser humano, tales como madera, leña, semillas comestibles, resinas, captura de carbono (como CO<sub>2</sub>), filtración de lluvia a los mantos acuíferos, oxígeno (O<sub>2</sub>), y más. En este trabajo se recopiló una base de datos de 13 estudios, que representaron 18 unidades de análisis, las cuales fueron usadas para calcular el tamaño del efecto de cada unidad y la heterogeneidad entre estudios. Este trabajo tiene como objetivo demostrar mediante un meta análisis de proporciones que los procesos de embriogénesis somática deben ser adaptados a cada especie del género *Pinus L.*, en función de sus requerimientos ambientales y nutricionales. De acuerdo con los tamaños del efecto cada estudio analizado tiene una heterogeneidad entre estudios muy alta, e incluso podemos notar que en el

modelo de efectos aleatorios a excepción del estudio 1, la mayoría de resultados difieren del resultado final del meta análisis, dado que la línea imaginaria vertical no cruza sus intervalos de confianza. En cambio, la línea imaginaria vertical del modelo de efectos fijos cruza dos estudios que corresponden a 3 unidades analizadas (1, 8 y 9), lo que indica que estos estudios no difieren del resultado final del meta análisis.

**Palabras clave:** biotecnología, tamaño del efecto, variables, unidades analizadas, análisis estadístico

**ABSTRACT:**

The genus *Pinus* L. stands out for its ecological, economic and cultural importance, since from it derive many goods and services that the human being uses, such as wood, firewood, edible seeds, resins, carbón (as CO<sub>2</sub>) sequestration, filtration of rain to the aquifers, oxygen (O<sub>2</sub>), and more. In this work, a database of 13 studies was compiled, representing 18 units of analysis, which were used to calculate the effect size of each unit and the heterogeneity between studies. This work aims to demonstrate through a meta-analysis of proportions that somatic embryogenesis processes must be adapted to each species of the genus *Pinus* L., depending on their environmental and nutritional requirements. According to the effect sizes, each study analyzed has a very high heterogeneity between studies, and you can even notice that in the random effects model except study 1, the most results differ from the final result of the meta analysis, since the vertical imaginary line does not cross its confidence intervals. In contrast, the vertical imaginary line of the fixed effects model crosses two studies corresponding to 3 units analyzed (1, 8 and 9), which indicates that these studies do not differ from the final result of the meta analysis.

**Key words:** bitechnology, effect size, variables, units analysed, statistic analysis.

## INTRODUCCIÓN

En el mundo existen cerca de 111 especies del género *Pinus L.* (Manzanilla-Quiñones et al., 2018), de las cuales algunas se encuentran en peligro de extinción en vida silvestre, principalmente por el consumo de su semilla, el uso de la madera, entre otras.

El género *Pinus* es de gran importancia ya que de él derivan muchos bienes y servicios que aprovecha el ser humano, tales como madera, leña, semillas comestibles, resinas, entre otros. Los servicios de éstos, se enfocan principalmente en la captura de (CO<sub>2</sub>), filtración de lluvia a los mantos acuíferos, disminución de temperaturas, oxígeno (O<sub>2</sub>), y más. Por lo anterior, el género *Pinus L.* se destaca por su importancia ecológica, económica y cultural (Sánchez-González, 2008).

Su potencial adaptativo en algunas especies es alto al crecer en lugares con poca precipitación, altitudes superando los 3000 msnm como lo es *Pinus hartwegii* Lindl. Además, las semillas de este género son recolectadas para su comercialización (atendiendo a la producción de planta nueva para reforestaciones y/o estudios de mejoramiento genético y biotecnología) y, consumo como lo son las semillas de los pinos piñoneros, de ahí que se destaca su importancia para conservar y propagar las especies del género.

Por ello se debe tomar en cuenta la prioridad actual de propagar dichas especies, asegurando que mantengan sus características de calidad y que además exista una elevada producción y, así mismo se conserven. La multiplicación masiva logra dicho objetivo a través de la propagación vegetativa (micropropagación), evitando así la pérdida de las características de calidad de las especies (Rebolledo-Camacho et al., 2006).

Una de las técnicas más utilizada en la propagación clonal es la embriogénesis somática, que se lleva a cabo mediante el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos principalmente de la especie a propagar. Es una técnica biotecnológica de gran

importancia para la conservación no solo de las especies, sino que también garantiza la variabilidad genética de éstas, además de conservar sus características de calidad.

Por otro lado el meta análisis al ser el análisis estadístico de una gran colección de resultados de trabajos individuales y, tener como propósito integrar de forma objetiva y sistemática los resultados de estudios empíricos acerca de un problema de investigación (Sánchez-meca, 2010). Resulta una estrategia idónea para deducir heterogeneidad entre estudios, y de esta forma demostrar que cada especie del género *Pinus* L., debe contar con su protocolo de embriogénesis somática atendiendo sus requerimientos ambientales y nutricionales individualmente.

## **MÉTODOS**

El meta análisis se realizó para conocer la heterogeneidad entre estudios y de ésta manera demostrar que los procesos de embriogénesis somática no pueden generalizarse completamente, por tanto debe hacerse un protocolo para cada especie del género *Pinus*.

### **Búsqueda bibliográfica**

En el caso de los términos de búsqueda, hasta donde se tiene conocimiento existen pocos trabajos relacionados con el tema, por tanto, la búsqueda se hizo de forma general quedando de la siguiente manera: 1) “Embriogénesis somática” en Pinos. 2) “Somatic embryogenesis” in *Pinus*. 3) “Cultivo *in vitro*” en Pinos. 4) “Tissues culture” in *Pinus*. 5) Embriogénesis somática en el género *Pinus*. Siendo los principales buscadores utilizados: 1) Google scholar. 2) Mendeley. 3) Scopus. 4) Y sitios de revistas: Redalyc y Scielo.

Se buscó que reportaran 1) Concentraciones y tiempos en el método de esterilización, 2) Sales minerales. 3) Explante utilizado, 4) Número mínimo y máximo de explantes iniciales, y finales, 5) Tipo de explante: maduro o inmaduro,

y 6) tipo de documento: tesis o artículos publicados. Con respecto al sesgo del idioma se buscaron estudios hechos en inglés y español para disminuir éste.

### Análisis estadístico

El software que se utilizó para hacer el meta análisis de proporciones fue R studio en su versión 3.6.1 Para el análisis estadístico se siguió el manual propuesto por (Wang, 2018), en el cual el tamaño del efecto se calcula como sigue:

$$ES_p = p = \frac{k}{n} \quad (1.1)$$

Donde  $ES$  es el tamaño del efecto,  $p$  es la proporción,  $k$  es número de individuos o casos de interés y  $n$  es el tamaño de muestra.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 30 estudios con 53 unidades de análisis se incluyeron 13 estudios, que representaron 18 unidades de análisis (Tabla 1) y, al menos 17 estudios con 35 unidades de análisis se descartaron, por no cumplir con los criterios para realizar el meta análisis de proporciones.

Tabla 2: Características de los estudios incluidos en el meta análisis

ESTUDIO	ESPECIE	VARIABLE
OJeda-Zacarias, (1996)	<i>Pinus halapensis</i> Mill.	SM. Explante TE.
Carneros-García, (2009)	<i>Pinus pinea</i> L.	SM. Explante TE.
OJeda-Zacarias, (2007)	<i>Pinus maximartinezii</i> Rzed.	SM. Explante TE.

Cantillo-Ardebol et al., (2006)	<i>Pinus cubensis</i> Griseb.	SM. Explante TE.
Cantillo-Ardebol et al., (2011)	<i>Pinus cubensis</i> Griseb.	SM. Explante TE.
(Robledo-Paz et al., 2009)	<i>Pinus maximartinezii</i> Rzed.	SM. Explante TE.
Stojicic et al., (2007)	<i>Pinus heldreichii</i> H. Christ.	SM. Explante TE.
Niskanen et al., (2004)	<i>Pinus sylvestris</i> L.	SM. Explante TE.
Malabadi & Nataraja, (2007)	<i>Pinus gerardiana</i> Wall.	SM. Explante TE.
Malabadi & Van- Staden, (2005)	<i>Pinus patula</i> L.	SM. Explante TE.
Malabadi & Nataraja, (2007)	<i>Pinus wallichiana</i> A. B. Jacks	SM. Explante TE.
Malabadi & Nataraja, (2007a)	<i>Pinus roxburghii</i> Sarg.	SM. Explante TE.
Vejsadová et al., (2008)	<i>Pinus uncinata</i> DC <i>subsp</i> <i>uliginosa</i> (Neumann) Businský	SM. Explante TE.

---

MC: Sales minerales; TE: tipo de explante

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del meta análisis:

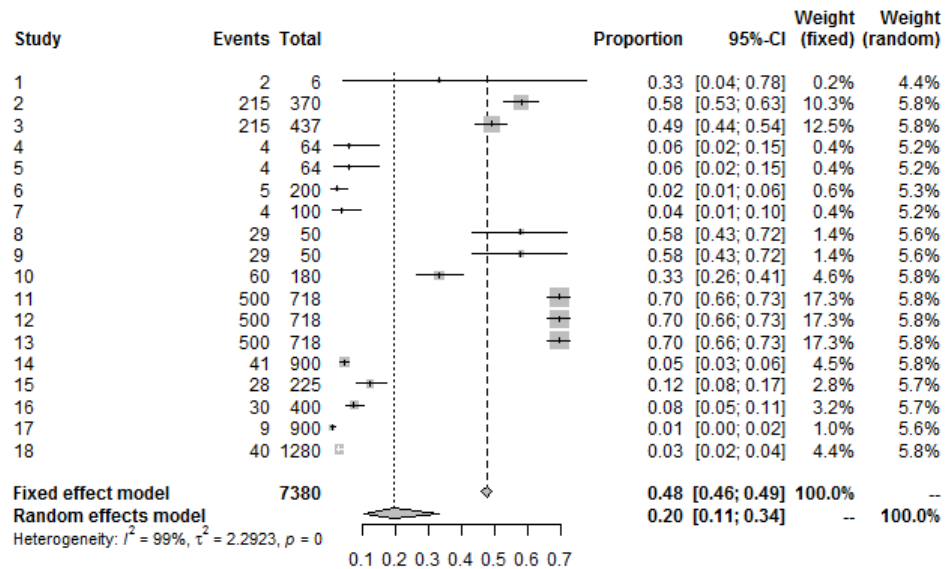


Figura 1: Gráfico forest de los tamaños del efecto por estudio.

De acuerdo a la Figura 1 los tamaños del efecto por estudio analizado tienen una heterogeneidad entre estudios muy alta, e incluso podemos notar que en el modelo de efectos aleatorios a excepción del estudio 1, la mayoría de resultados difieren del resultado final del meta análisis, dado que la línea imaginaria vertical no cruza sus intervalos de confianza. En cambio, la línea imaginaria vertical del modelo de efectos fijos cruza dos estudios que corresponde a 3 unidades analizadas (1, 8 y 9), lo que indica que estos estudios no difieren del resultado final del meta análisis.

En el caso de valores atípicos (outliers) y estudios influyentes, no se encontraron en las pruebas de diagnóstico realizadas (Figura 2).

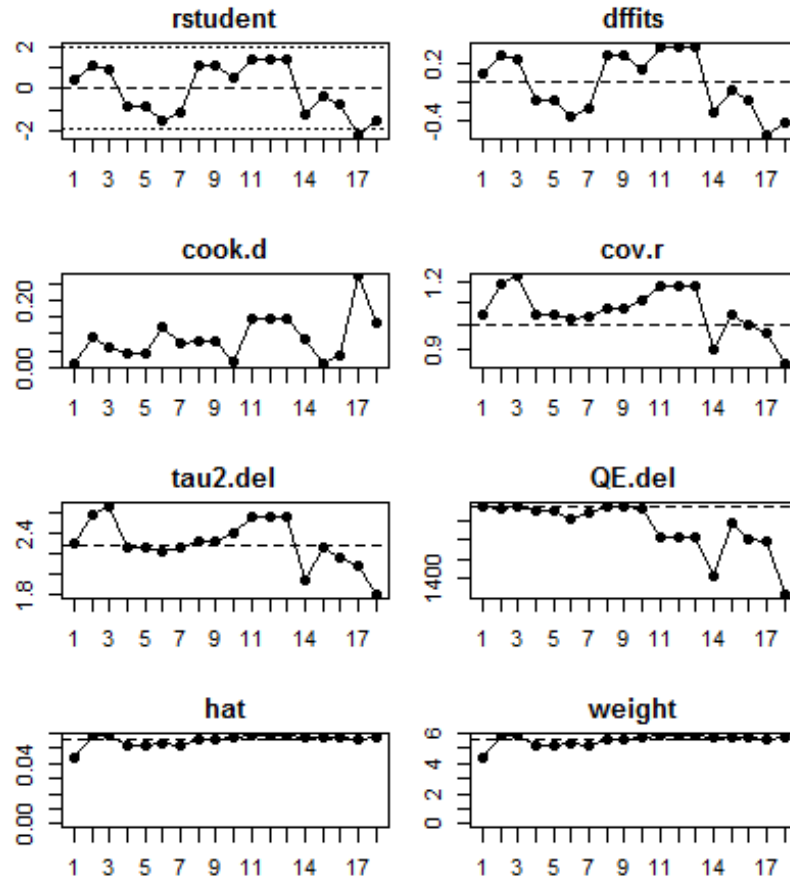


Figura 2: Pruebas de diagnóstico para detectar outliers y estudios influyentes.

De acuerdo a (Wang, 2018) si existieran estudios influyentes y outliers, éstos estarían marcados en rojo en la gráfica.

Por otro lado (Escrig Sos et al., 2021) menciona que la heterogeneidad se presenta cuando entre los estudios usados en el meta análisis existe discrepancia metodológica, por ejemplo, cuando no tienen el mismo objetivo, cuando los ensayos aplicados no son exactamente aplicados aunque lleven el mismo nombre, cuando las variables no están medidas exactamente igual y cuando alguno de los estudios presenta algún sesgo en los resultados.

Atendiendo a lo que se menciona en el párrafo anterior, con ayuda de la Tabla 3, se muestra de una manera rápida la presencia de heterogeneidad en las unidades analizadas.



Tabla 3: Id de estudios, especie, variables analizadas (Explante, tipo de explante y sales minerales)

<b>ID</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>EXPLANTE</b>	<b>TE</b>	<b>SM</b>
1	<i>Pinus halapensis</i> Mill.	Embriones	Maduro	DCR
2	<i>Pinus pinea</i> L.	Embriones	Maduro	LP
3	<i>Pinus pinea</i> L.	Embriones	Maduro	Pullman
4	<i>Pinus</i> <i>maximartinezii</i> Rzed.	Embriones	Maduro	DCR
5	<i>Pinus</i> <i>maximartinezii</i> Rzed.	Embriones	Maduro	GD
6	<i>Pinus cubensis</i> Griseb.	Embriones	Maduro	MS
7	<i>Pinus cubensis</i> Griseb.	Embriones	Maduro	MS
8	<i>Pinus</i> <i>maximartinezii</i> Rzed.	Cotiledones	Maduro	GD
9	<i>Pinus</i> <i>maximartinezii</i> Rzed.	Cotiledones	Maduro	SH
10	<i>Pinus heldreichii</i> <i>H. Christ.</i>	Embriones	Maduro	GD
11	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Embriones	Inmaduro	MSG
12	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Embriones	Inmaduro	Pullman
13	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Embriones	Inmaduro	DCR
14	<i>Pinus gerardiana</i> Wall.	Embriones	Maduro	MSG

15	<i>Pinus patula</i> L.	Yemas	Maduro	DCR
16	<i>Pinus wallichiana</i> A. B. Jacks.	Yemas	Maduro	DCR
17	<i>Pinus roxburghii</i> Sarg.	Acículas	Maduro	DCR
18	<i>Pinus uncinata</i> DC subsp. <i>Uliginosa</i> (Neumann) Businský.	Embriones	Maduro	DCR

---

En las 7 unidades de análisis que ocupan las mismas sales minerales DCR, existe heterogeneidad entre los estudios principalmente porque la especie en cada unidad es diferente, además en la unidad 15 y 16 el explante utilizado cambia de embrión maduro a yemas maduras, y en la unidad 17 son acículas maduras, en estos casos la evidencia de la heterogeneidad es clara.

Pero en el caso donde se ocupa el mismo medio de cultivo, y la misma especie *Pinus sylvestris* como es el caso de los estudios realizados por (Burg et al., 2007) y (Niskanen et al., 2004) la evidencia de la heterogeneidad se debe a que el objetivo del trabajo no es el mismo principalmente.

De manera similar las unidades 3 y 12 ocupan las sales minerales Pullman y los explantes utilizados son embriones maduros, nuevamente encontramos que la especie es la que marca una diferencia significativa para la heterogeneidad entre ambos estudios.

Dicho lo anterior, en adelante nos enfocaremos en discutir las variables que se utilizaron en cada una de las unidades analizadas y, el por qué no pueden ser

generalizados los protocolos de embriogénesis somática en el género *Pinus* a grandes rasgos.

En el estudio realizado por (Montalbán et al., 2021) se aprecia claramente como los resultados difieren a pesar de usar las mismas sales minerales (Glitz) en la inducción del tejido embriogénico. Esto se debe principalmente a que realizaron tres tratamientos en los cuales ocuparon diferentes explantes: megagametofitos, embriones cigóticos y embriones cigóticos más una nodriza.

Otro estudio realizado por (Mendoza Maya, 2011) en el cual induce brotes a partir de embriones y cotiledones aislados de *Pinus pseudostrobus* Lindl., muestra una vez más que el simple hecho de cambiar el tipo de explante utilizado implica un cambio en los resultados obtenidos, en este caso la inducción de brotes fue nula en cotiledones de 15 días de edad, mientras que en embriones completos y cotiledones aislados de 3 días de edad, si hubo inducción de brotes.

Un estudio más llevado a cabo por (García-Mendiguren et al., 2016) donde ocupó las sales minerales EDM y embriones inmaduros de *Pinus radiata* D, Don., mostró diferencia significativa entre familias de semillas, temperaturas y el agente gelificante usado.

Con éste estudio se observa que existe también heterogeneidad entre familias de la misma especie, además, de que los porcentajes de iniciación de tejido embriogénico también se ve influenciado, a mayor temperatura, menor inducción, a temperaturas menores, mayor porcentaje de iniciación del tejido.

Por otra parte, mientras la concentración de agente gelificante sea mayor, la inducción del tejido será mayor, y si la concentración es menor, la inducción del tejido embriogénico será menor. Lo cual hace notar que la mayoría de las variables que pueden ser evaluadas con un meta análisis, producirían una gran heterogeneidad en los tamaños del efecto de éste.

Siguiendo la idea anterior es conveniente mencionar que las diferentes sales minerales están hechas con el fin de optimizar las necesidades de plantas

específicas, por lo cual se han formulado varias mezclas salinas (Hurtado M. & Merino M., 2014). No obstante algunas fórmulas han sido modificadas con el tiempo, con la intención de lograr mejores resultados en la inducción de los procesos de embriogénesis somática.

Los protocolos de embriogénesis somática comúnmente van acompañados de diferentes experimentos usando sales minerales, explantes y etapas de desarrollo del explante diferentes, para conocer cuáles son los nutrientes y condiciones ambientales óptimas para la inducción y desarrollo del material embriogénico de la especie que se esté trabajando.

Un ejemplo de lo anterior es el estudio realizado en *Pinus kesiya* Royle ex Gord., por (Chitta Ranjan & Tandon, 2004) donde ocuparon tres diferentes medios de cultivo (MS, mMS y DCR) y como explantes usaron embriones cigóticos, secciones de yemas apicales y acículas secundarias.

Pero no solo es importante considerar la heterogeneidad entre las sales minerales, los explantes y el estado de desarrollo de éstos. También es de importancia considerar las condiciones ambientales de las especies, que son otra fuente de variabilidad. Como plantea (Pereira et al., 2020) su trabajo tenía como objetivo inducir estrés en megagametofitos exponiéndolos a altas temperaturas ( 23, 40 y 60°C) por cinco minutos para evaluar la tasa de iniciación de tejido embriogénico. Sus resultados muestran que aquellos megagametofitos expuestos a 40 °C tienen una mayor tasa de iniciación, mientras que los expuestos a 60°C tienen una menor tasa de iniciación. Para el grupo control uso 23°C teniendo la menor tasa de iniciación en el experimento. Por tanto con el anterior trabajo se deduce que deben ser tomados en cuenta aspectos ambientales, como en este caso la temperatura, en la creación de protocolos de procesos de embriogénesis somática.

Además es de importancia considerar si los métodos que se usan en los protocolos de esterilización de los explantes iniciales son otra fuente de variabilidad. Como dice (Robledo-Paz et al., 2009) en su trabajo realizado en

*Pinus* donde se usaron dos métodos de esterilización con el objetivo de obtener plántulas asépticas que permitieran mejores respuestas de los explantes in vitro.

Un método de esterilización ocupó cloro (1.8 % v/v) por 20 minutos sumergiendo el material dos veces, y el otro colocando en un matraz Erlenmeyer una solución de 3% v/v de peróxido de hidrógeno, el cual se colocó el material vegetativo inicial, y esta solución se estuvo cambiando cada 2 días hasta la emergencia de la radícula (7 días). Logrando en ambos 100% de material libre de infección.

## **CONCLUSIONES**

Las fuentes de heterogeneidad en los protocolos de embriogénesis somática se deben a muchos factores, que están dentro del conjunto de las condiciones ambientales y los requerimientos nutricionales de las plántulas. Dando esto la heterogeneidad entre los protocolos existentes de embriogénesis somática que fueron analizados en éste trabajo, cumpliendo así el objetivo del estudio.

Al quedar demostrada que la heterogeneidad existente entre los estudios utilizados en el presente trabajo es alta, abre la posibilidad para considerar la realización de futuros trabajos utilizando variables más específicas para evaluar, por ejemplo, si existe la posibilidad de generalizar algunos aspectos de los protocolos de embriogénesis somática en el género *Pinus* L., principalmente en requerimientos nutricionales (por ejemplo si al adicionar alguna vitamina al medio de cultivo, existe alguna mejora en número de explantes, elongación, inducción de raíz, entre otros), explantes utilizados, y otros.

Por otro lado se sugiere realizar meta análisis entre protocolos de la misma especie para conocer si existen diferencias significativas entre diferentes procedencias, tipo de explante utilizado, las diferentes etapas de desarrollo del explante, etc. Aún hay muchos temas por evaluar que pueden ayudar a minimizar los tiempos en la creación de nuevos protocolos de los procesos de embriogénesis somática.

## LITERATURA CITADA

- Burg, K., Helmersson, A., Bozhkov, P., & Von Arnold, S. (2007). Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 687–698. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl241>
- Cantillo-Ardebol, R., Igarza-Castro, J., & Ochoa, A. M. (2011). Propagación in vitro de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. *Biotecnología Vegetal*, 11(1), 3–13.
- Cantillo-Ardebol, R., Rodríguez-de Francisco, L., Rosales, Y., & Alvarado, O. G. (2006). Germinación in vitro de *Pinus cubensis* Griseb. *Ciencias Olguín*, 12, 1–12.
- Carneros-García, E. (2009). Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Universidad de Alcalá.
- Chitta Ranjan, D., & Tandon, P. (2004). Factors influencing initiation of embryogenic cultures in *Pinus kesiya* Royle ex Gord. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 589–593.
- Escrig Sos, V. J., Lluca Abella, J. A., Granel Villach, L., & Bellver Oliver, M. (2021). Metaanálisis: una forma básica de entender e interpretar su evidencia. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 34, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.senol.2020.05.007>
- García-Mendiguren, O., Montalbán, I. A., Goicoa, T., Ugarte, M. D., & Moncaleán, P. (2016). Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Trees*, 30, 949–958. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1336-7>
- Hurtado M., D. V., & Merino M., M. E. (2014). *CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES*. Trillas. [https://etrillas.mx/libro/cultivo-de-tejidos-vegetales\\_3256](https://etrillas.mx/libro/cultivo-de-tejidos-vegetales_3256)

- Malabadi, Ravindra B, & Nataraja, K. (2007). Putrescine Influence Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Pinus gerardiana* Wall. *American Journal of Plant Physiology*, 2(2), 107–114.
- Malabadi, Ravindra B, & Nataraja, K. (2007a). Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis Using Secondary Needles of Mature Trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *International Journal of Botany*, 3(1), 40–47.
- Malabadi, Ravindra B, & Nataraja, K. (2007b). Smoke-saturated Water Influences Somatic Embryogenesis Using Vegetative Shoot Apices of Mature Trees of *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. *Journal of Plant Sciences*, 2(1), 45–53.
- Malabadi, Ravindra B, & Van-Staden, J. (2005). Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology*, 25, 11–16.
- Manzanilla-Quiñones, U., Aguirre-Calderón, Ó. A., & Jiménez-Pérez, J. (2018). ¿Qué es una conífera y cuantas especies existen en el mundo y en México? *Desde El Herbario CICY*, 10, 168–175.
- Mendoza Maya, E. (2011). Micropropagación clonal de genotipos superiores de *Pinus pseudostrobus* Lindl. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Montalbán, I. A., Castander-Olarieta, A., Hargreaves, C. L., Gough, K., Reeves, C. B., Ballekom, S. van, Goicoa, T., Ugarte, M. D., & Moncaleán, P. (2021). Hybrid pine (*Pinus attenuata* × *Pinus radiata*) somatic embryogenesis: What do you prefer, mother or nurse? *Forests*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/f12010045>
- Niskanen, A., Lu, J., Seitz, S., Keinonen, K., Von-Weissenberg, K., & Pappinen, A. R. I. (2004). Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiology*, 24, 1259–1265.
- OJeda-Zacarias, M. del carmen. (1996). *INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halapensis* (Mill). Universidad Autónoma de Nuevo León.

- OJeda-Zacarias, M. del carmen. (2007). *REGENERACIÓN in vitro DEL PIÑÓN AZUL Pinus maximartinezii (Rzed)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pereira, C., Castander-Olarieta, A., Montalbán, I. A., Pěňčík, A., Petřík, I., Pavlović, I., De Medeiros Oliveira, E., Pacheco de Freitas Fraga, H., Guerra, M. P., Novák, O., Strnad, M., Canhoto, J., & Moncaleán, P. (2020). Embryonal masses induced at high temperatures in Aleppo pine: Cytokinin profile and cytological characterization. *Forests*, 11. <https://doi.org/10.3390/f11080807>
- Rebolledo-Camacho, V., Aparicio-Rentería, A., & Cruz-Jiménez, H. (2006). ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA PROPAGACIÓN in vitro DE DOS ESPECIES DE PINOS. *Foresta Veracruzana*, 8, 27–32.
- Robledo-Paz, A., Villalobos-Arámbula, V. M., & Santacruz-Varela, A. (2009). Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Acta Botanica Mexicana*, 89, 47–62.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión de la diversidad actual y distribución de los pinos de México. *Madera Bosques*, 14(1), 107–120. <https://doi.org/10.21829/myb.2008.1411222>
- Sánchez-meca, J. (2010). Cómo realizar una revisión sistemática y un meta-análisis \*. *Aula Abierta*, 38, 53–63.
- Stojicic, D., Uzelac, B., Dusica, J., Culafic, L., & Budimir, S. (2007). INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Pinus heldreichii* CULTURE. *Arch. Biol. Sci*, 59(3), 199–202. <https://doi.org/10.2298/ABS0703199S>
- Vejsadová, H., Vlašínová, H., & Havel, L. (2008). PRESERVATION OF A RARE BOG PINE GENOTYPES USING MICROPROPAGATION TECHNIQUES. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 56(4), 197–206.
- Wang, N. (2018). *Conducting Meta-Analyses of Proportions in R*. June. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27199.00161>



## CONCLUSIONES GENERALES

La embriogénesis somática es un recurso sumamente valioso para preservar y conservar especies vegetales. Por tanto, es importante no solo seguir creando protocolos de embriogénesis somática para cada especie del género *Pinus* L., sino en conjunto con éstos, también crear análisis estadísticos como el meta análisis para evaluar la heterogeneidad entre y dentro de esos protocolos, para así conocer a que nivel podemos generalizarlos con otra especie y así, poder minimizar cada vez más el tiempo de creación de éstos.

Los protocolos de embriogénesis somática son creados con el objetivo de conocer el medio de cultivo, reguladores de crecimiento, explante y etapa de desarrollo del explante. En conjunto con el medio ambiente óptimo en el cual la especie que se esté trabajando sea micropropagada eficazmente. Para posteriormente, los individuos obtenidos de este proceso sean ocupados en reforestaciones, estudios de ingeniería genética, plantaciones comerciales, etc.

Aún hay mucho por hacer en esta área que para muchos es el último recurso para combatir el cambio climático, y las diferentes problemáticas ambientales de la actualidad. Con este trabajo se espera ampliar el panorama para futuros investigadores interesados en la biotecnología y genética forestal. Si bien este trabajo como muchos, son los primeros esfuerzos para demostrar que esta área puede tener un alcance mayor al esperado en cuestiones ambientales.

No olvidemos que México posee una riqueza natural vasta y que por ello tenemos una gran responsabilidad con el cuidado y preservación de ésta.

Finalmente en palabras de Thomas Leding:

“Un regalo de México al mundo es el maíz, por supuesto, pero otro, son los pinos”.