



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS *in vitro*

DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

P R E S E N T A

GABRIELA IRENE LILIA VILCHIS GARCÍA

Chapingo, Texcoco, Estado de México
Diciembre de 2008

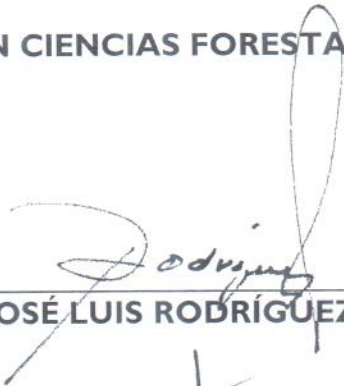


“RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS *in vitro* DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS”

Tesis realizada por **Gabriela Irene Lilia Vilchis García** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



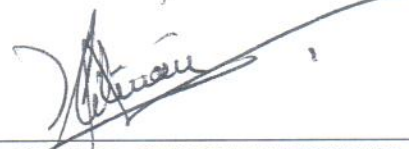
DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



DRA. AMPARO BORJA DE LA ROSA

ASESOR:



DR. DAVID CIBRIAN TOVAR

ASESOR:



Ph. D. HUGO RAMÍREZ MALDONADO

Chapingo, Texcoco, Estado de México
Diciembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional que instituciones y amigos me han brindado y es mi deseo expresar mi más cumplido agradecimiento a:

La Universidad Autónoma Chapingo, la cual a través de la Coordinación de Posgrado de la División de Ciencias Forestales, me dio la oportunidad de emprender y concluir mi formación académica de postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado.

Dr. José Luis Rodríguez De La O, por su calidez humana, por la dirección, paciencia, amistad, sugerencias y su amplia experiencia para el desarrollo del programa de posgrado y la dirección de esta tesis.

Dra. Amparo Borja De La Rosa, quien siempre ha estado al pendiente de los estudiantes de Posgrado del programa que atinadamente dirige, por el honor de asesorar mi trabajo.

Ph. D. Hugo Ramírez Maldonado, en quién reconozco su gran calidad humana y su amplia sabiduría; por aceptar asesorar el desarrollo de este trabajo y sus atinadas sugerencias para mejorarlo en todo lo posible.

Dr. David Cibrián Tovar, quién además de haberme transmitido sus conocimientos, su asesoría, su amistad y la satisfacción de que aceptara ser mi asesor en este trabajo al ser un profesional ampliamente distinguido en nuestro País.

Ing. Norma M. Aguilar Díaz, por el apoyo y capacitación que me brindó durante toda la fase experimental de este proyecto, pero sobre todo por su infinita amistad y cariño.

A mis profesores, compañeros y amigos del programa de maestría.

A todas aquellas personas e Instituciones que me han apoyado y que de manera involuntaria haya omitido su mención

DEDICATORIA

Con gratitud, aprecio y respeto, quiero dedicar esta Tesis a:

A la memoria de mi querido Padre Fernando

Por su ejemplo que desde niña me inspiro a superarme en la vida tanto en lo profesional como en lo personal por sus cuidados y protección, sin los que no hubiera llegado a este lugar, siempre estará en mi corazón.

A mi adorada Madre Silvia

Por sus cuidados, su infinita ayuda y todo el amor que siempre ha tenido para mí, sin ella nunca se habrían logrado las cosas que hasta el día de hoy tengo.

“Dios los Bendiga siempre”
¡ Gracias ...!

A mi amada bebita María José

Mi inspiración para ser cada día una mejor mujer, es mi vida, y lo mejor que me ha pasado.

A Mis hermanos: Silvia, Pedro y Fernando

Con el cariño que siento por ellos, por el recuerdo de nuestra niñez que siempre nos mantendrá unidos como una gran familia.

A mis sobrinos, tías, primos y demás familia, mi respeto y cariño.

A mis amigos por su paciencia y lealtad.

Gabriela

DATOS BIOGRAFICOS

La autora nació el 2 de julio de 1970 en Toluca, Estado de México.

Realizó estudios de educación primaria de 1976 a 1982 en la primaria oficial Lic. Juan Fernández Albarrán de la Ciudad de Toluca México.

De 1982 a 1985 los estudios de secundaria en la secundaria oficial número 2 Lic. Adolfo López Mateos en Toluca Estado de México.

De septiembre de 1985 a julio de 1988, realizó los estudios de bachillerato en la preparatoria oficial Ignacio Ramírez de la Universidad Autónoma del Estado de México.

De septiembre de 1996 a junio de 2001 curso sus estudios profesionales en el Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

De 1996 a 2005, fungió como técnico de plantaciones forestales comerciales en PROBOSQUE del Gobierno del Estado de México.

De 2005 a 2007, desarrolló estudios de Postgrado en la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo.

En 2007, fungió como jefe de sanidad forestal en la empresa Agros Navidad S.A. de C.V.

CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
DATOS BIOGRAFICOS	iii
CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Importancia del recurso forestal a nivel mundial.....	4
3.2. Comercio internacional de maderas.....	6
3.2.1. Maderas de zonas templadas.....	6
3.2.2. Maderas finas.....	8
3.3. Importancia del recurso forestal en México.....	10
3.3.1. Superficie forestal Mexicana.....	10
3.3.2. Estado actual de las áreas forestales en México.....	12
3.3.3. Principales especies forestales mexicanas.....	12
3.3.4. Áreas potenciales para ser utilizadas con recursos forestales.....	13
3.4. Situación del género <i>Pseudotsuga</i> en México.....	15
3.4.1. Distribución.....	16
3.4.2. Clasificación taxonómica.....	17
3.4.3. Característica morfológicas de la especie <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous.....	17
3.4.4. Corteza.....	18
3.4.5. Hojas.....	18
3.4.6. Flor.....	18
3.4.7. Fruto.....	19
3.4.8. Madera.....	19
3.4.9. Semilla.....	20
3.4.10. Hábitat.....	21
3.4.11. Plagas y enfermedades de <i>Pseudotsuga</i> en México.....	21
3.5. Propagación forestal <i>in vitro</i>	23

3.5.1. Embriogénesis <i>in vitro</i>	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Ubicación del experimento.....	27
4.2. Procedencia del material vegetal.....	27
4.3. Desinfestación del material vegetal.....	27
4.4. Medio de cultivo.....	28
4.4.1. Medio para promover la iniciación de callos embriogénicos.....	28
4.4.2. Medio para inducir la embriogénesis somática.....	29
4.4.3. Medio para fomentar la diferenciación embriogénica.....	30
4.5. Cultivo.....	31
4.5.1. Cultivo de embriones cigóticos.....	31
4.5.2. Subcultivo de callos embriogénicos.....	31
4.6. Incubación.....	32
4.7. Evaluación del crecimiento de callos en medio MS(1962) con BA, 2,4-D y KIN.....	32
4.7.1. Modelo estadístico.....	33
4.8. Evaluación de la inducción de embriogénesis somática.....	34
4.8.1. Modelo estadístico.....	34
4.9. Evaluación de la diferenciación embriogénica.....	35
4.9.1. Modelo estadístico.....	36
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1. Respuestas obtenidas a la iniciación de callos embriogénicos.....	37
5.2. Respuestas obtenidas a la inducción de la embriogénesis somática.....	40
5.3. Respuestas obtenidas de la diferenciación embriogénica.....	45
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
VII. ANEXOS	50
7.1. Medio básico de Murashige y Skoog (MS,1962).....	50
7.2. Vitaminas WS (aguilar, 1997).....	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro No. 1. Áreas forestales del mundo al año 2000.....	5
Cuadro No. 2. Estimación de la producción de madera por sectores en los 10 mayores productores del mundo (miles de m ³)	10
Cuadro No. 3. Resultados de los tratamientos de diferenciación embriogénica por la prueba de Tukey	46
Cuadro No. 4. Medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962)	50
Cuadro No. 5. Vitaminas WS (Aguilar, 1997)	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura No. 1. Superficie total forestal por ecosistema.....	14
Figura No. 2. Superficie de las principales zonas forestales	14
Figura No. 3. Centro de origen (CO) y rutas de dispersión del género <i>Pseudotsuga</i>	16
Figura No.4. Aspecto de la corteza de <i>Pseudotsuga</i>	18
Figura No. 5. Acículas del último periodo vegetativo de <i>Pseudotsuga</i>	18
Figura No. 6. Flor masculina y femenina de <i>Pseudotsuga</i>	19
Figura No. 7. Fruto de <i>Pseudotsuga</i>	19
Figura No. 8. Semilla de <i>Pseudotsuga</i>	20
Figura No. 9. Obtención de callos embriogénicos cultivados de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous en los tratamientos I(CE1) y 2(CE2)	39
Figura No. 10. Etapas de crecimiento de los callos y de embriones somáticos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous durante 90 días en los tratamientos CE1 y CE2	40
Figura No. 11. Resultados sobre la inducción de la embriogénesis somática a partir de callos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous	44
Figura No. 12. Callos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous en un medio con sales MS de proliferación (MP) y de suspensión embriogénica (SE)	44
Figura No. 13. Embriones de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous a partir de callos, estructuras, obtenidos en medio MS (1962) al 100% con variaciones DE1, DE2, DE3, DE4 y DE5	47
Figura No. 14. Niveles de necrosamiento obtenidos en callos de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous después de 50 días de incubación bajo los tratamientos sin carbón activado con medio básico MS (1962) y vitaminas WS al 100% bajo las variaciones DE1, DE2, DE3, DE4 y DE5	47

RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS *in vitro* DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS

EMBRYOGENIC RESPONSES OF *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS *in vitro* CONDITIONS

Gabriela I. L. Vilchis García¹

José L. Rodríguez De La O²

RESUMEN

A partir del cultivo *in vitro* embriones cigóticos maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous se obtuvieron embriones somáticos. Identificándose las respuestas en cuanto la formación de embriones de manera directa y a partir de callos con diferente capacidad embriogénica. En los medios de cultivo se emplearon las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con tiamina 0.40 mg.L⁻¹, piridoxina 60.0 mg.L⁻¹, y combinando diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) 0.0, 3.0 y 8.0 mg.L⁻¹ y kinetina con 0.0 y 4.0 mg.L⁻¹ y como coadyuvantes se empleo la caseína hidrolizada 500.0 mg.L⁻¹ y L-glutamina 500 mg.L⁻¹ el empleo del 2,4-D mg.L⁻¹, benciladenina (BA) 1.0 mg.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100.0 mg.L⁻¹, permitio el desarrollo de callos. El medio básico MS (1962), donde se disminuyeron las fuentes de nitratos a un 50%, y 75% aumentando los fosfatos al 200%, y el amonio disminuido al 25%, agregando el polietilén-glicol (PEG) 7.5 gr.L⁻¹ más caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ desarrollaron callos con una elevada capacidad embriogénica, así como la conformación de diversas estructuras embrionarias. La maduración de proembriones y la diferenciación de embriones se obtuvo en un medio MS (1962), incorporando glutamina 450 mg.L⁻¹ y caseína hidrolizada 500 mg.L⁻¹. y combinando diferentes tratamientos de BA y kinetina, así como concentraciones de carbohidratos destacando los medios con galactosa.

Palabras Clave: Embriones somáticos, cultivo *in vitro*, ácido 2,4 diclorofenoxiacético, kinetina, caseína hidrolizada, L-glutamina, benciladenina, polietilén- glicol, galactosa.

ABSTRACT

In this work were obtained somatic embryos from *in vitro* culture of mature zygotic embryos of *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Was identified the direct formation of embryos and also its formation from callus with different embryogenic capacities. As culture medium were used Murashige and Skoog (1962) (MS inorganic salts), supplemented with thiamine (0.40 mg.L⁻¹), pyridoxine (60.0 mg.L⁻¹), and combining different concentrations (0.0, 3.0, 8.0 mg.L⁻¹) of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin (0.0, 4.0 mg.L⁻¹), and was used as an adjunct hydrolyzed casein (500.0 mg.L⁻¹) and L-glutamine (500 mg.L⁻¹). The use of 2,4-D (1.0 mg.L⁻¹), bencyl adenin (BA) (1.0 mg.L⁻¹) and hydrolyzed casein (100.0 mg.L⁻¹), allowed the development of callus. In the Murashige and Skoog basic medium, the nitrates sources were reduced to 50% and 75%, the phosphates were increased to 200%, ammonia was reduced to 25%, and was added polyethylene glycol (PEG) (7.5 g.L⁻¹) and hydrolyzed casein (100 mg.L⁻¹). This allowed the development of callus with a high embryogenic capacity, as well as the formation of various embryonic structures. The maturation of pro embryos and the differentiation of embryos was obtained in a Murashige and Skoog medium, incorporating 450 mg.L⁻¹ of L-glutamine and 500 mg.L⁻¹ of hydrolyzed casein and mixing different BA treatments and kinetin, as well as concentrations of carbohydrates resulting outstanding the galactose medium.

Key words: Zygotic embryos, *in vitro* culture, 2,4- dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, hydrolyzed casein, L-glutamine, bencyl adenin, polyethylene glycol, galactose.

¹ Tesista

² Director de Tesis.

I. INTRODUCCIÓN

Pseudotsuga es uno de los géneros de árboles de mayor importancia económica a nivel mundial y desde mediados del Pleistoceno ha sido el principal componente de los bosques del oeste de Norteamérica (Hermann y Lavender, 1990).

Sus especies se localizan exclusivamente en dos grandes regiones del hemisferio norte, en el oeste de Norteamérica y en el sureste de Asia. *Pseudotsuga* forma bosques puros y continuos de gran extensión en la región costera y en las cordilleras del interior de Canadá y Estados Unidos, en cambio en el suroeste de este último país y en México su área se vuelve discontinua y fragmentada, formando poblaciones aisladas, la mayoría de las veces en convivencia con otras especies arbóreas (Farjon, 1990).

En México se distribuye a lo largo de tres sistemas montañosos: la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental (Martínez, 1963) y Sierra Madre del Sur (Debrecz y Racz, 1995). En la actualidad debido al aislamiento y la segmentación en su área de distribución, la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001 considera al género *Pseudotsuga* como un grupo taxonómico sujeto a protección especial desde el año de 1994, categoría que fue ratificada en el año 2002 (DOF, 2002).

No obstante la protección legal establecida en la citada Norma Oficial Mexicana, muchas de las poblaciones naturales de este género están sometidas a fuertes presiones antropogénicas, especialmente aquellas situadas en el límite de la frontera agrícola o en zonas de aprovechamiento forestal (maderero o de otra índole), por lo que existe un riesgo elevado de destrucción y pérdida de recursos genéticos valiosos.

La propagación exitosa de *Pseudotsuga*, como la mayoría de las coníferas, se da principalmente por semilla. De igual forma se realizan prácticas de reproducción

asexual empleando estructuras vegetativas, obtenidas de ramas y tallos de árboles jóvenes y aplicando hormonas para inducir su enraizamiento, aunque a la fecha para esta especie no se tienen buenos resultados.

Ante tal situación, los beneficios potenciales de la biotecnología son alentadores en silvicultura de la especie *Pseudotsuga*, ya que existe la posibilidad de ganar tiempo en los procesos de multiplicación, preservación y mejoramiento de la especie.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha permitido resolver problemas de producción de plantas y rendimiento en diversas especies maderables y de otros productos forestales mediante diferentes metodologías que permiten obtener material uniforme de alta calidad genética y libre de problemas fitosanitarios, principalmente en aquellas especies que únicamente se pueden reproducir a través de semillas.

La embriogénesis somática es una técnica biotecnológica de propagación de plantas que permite obtener embriones a partir de células somáticas desde cualquier tipo de tejido. Dicha técnica se ha convertido en el complemento idóneo de las prácticas de mejora clásica en diversas especies forestales.

El objeto del trabajo presentado a continuación es obtener embriones somáticos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, así como evaluar las respuestas embriogénicas a partir del cultivo *in vitro* de tejidos embriogénicos de semillas, al ser una especie de alto impacto ecológico y económico en México y el mundo.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la obtención de embriones somáticos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous mediante el cultivo de tejidos embrionarios.

2.2 Objetivos Específicos

Promover la obtención de embriones somáticos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros.

Evaluar los mejores coadyuvantes, tipos y concentraciones para la promoción de embriones somáticos.

Evaluar las condiciones que permitan la obtención de callos embriogénicos y su misma capacidad embriogénica.

Evaluar las respuestas embriogénicas a partir de callos obtenidos de embriones cigóticos cultivados *in vitro*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia del recurso forestal a nivel mundial

Según los cálculos efectuados en 2005, el total de la superficie forestal cubría el 30% de la superficie del planeta, es decir, casi 40 millones de km². Esto equivale aproximadamente a 0.62 hectáreas (6,200 m²) per capita, aunque su distribución es desigual. Estos cálculos se basan en los datos sobre la superficie forestal proporcionados por 228 países y territorios. (Cuadro 1).

La deforestación, y en particular la transformación de bosques en tierras de cultivo está avanzando a un ritmo alarmante. La superficie forestal mundial disminuyó en un 0.22% anual entre 1990 y 2000 y en un 18% anual entre 2000 y 2005. Sin embargo, la pérdida neta de bosques está disminuyendo como resultado de las repoblaciones forestales y la expansión natural de los bosques.

Los bosques primarios ocupan más de un tercio de la superficie forestal del planeta. Sin embargo, cada año la tala de árboles y otras actividades humanas ocasionan la pérdida o alteración de 60 000 km² de bosque primario (superficie similar a la de Irlanda). Las plantaciones forestales van en aumento, aunque representan menos del 5% del total de la superficie forestal. El resto está constituido principalmente por bosques naturales modificados y bosque seminaturales. (FAO, 2005)

Europa es también la región con la mayor área de bosques del mundo, con más de mil millones de hectáreas, lo que significa el 46% de su área total, seguida por Sur América con 875 millones de hectáreas, equivalente al 51% de su área total.

En América Latina el 10.3% del área boscosa está dentro de las reservas forestales y parques nacionales.

La pérdida del bosque natural es síntoma de otros problemas sociales incluyendo la falta de estímulos económicos y generación de fuentes de empleo en las zonas rurales.

Las maderas tradicionales provenientes de los bosques naturales, existentes en el comercio, se están acabando. Bajo estas circunstancias, la producción de maderas para abastecer el comercio mundial provendrá de las plantaciones forestales comerciales. En América Latina existen más de 12 millones de hectáreas de plantaciones forestales y se proyecta aumentarlas a 17 millones para el 2020. La reforestación ha sido más exitosa en los sitios en donde ha habido incentivos fiscales para su desarrollo, como en Brasil, Chile y Costa Rica. El nuevo producto de los bosques naturales es el turismo ecológico.

Cuadro 1. Cubierta forestal según subregiones 2005

Región/subregión	Área de bosque (1,000 ha)	% de área de la tierra	% del área forestal mundial
África oriental y meridional	226,534	27.8	5.73
África del Norte	131,048	8.6	3.32
África occidental y central	277,829	44.1	7.03
Total de África	635,412	21.4	16.08
Asia Oriental	244,862	21.3	6.20
Asia meridional y sudoriental	283,127	33.4	7.16
Asia occidental y central	43,588	4.0	1.10
Total de Asia	571,577	18.5	14.46
Total de Europa	1,001,394	44.3	25.34
Caribe	5,974	26.1	0.15
Centroamérica	22,411	43.9	0.57
Norteamérica	677,464	32.7	17.14
Total de Norteamérica y Centroamérica	705,849	32.9	17.86
Total de Oceanía	206,254	24.3	5.22
Total de Sudamérica	831,540	47.7	21.04
Mundo	3,952,025	30.3	100.00

1 hectárea (ha) = 10, 000 metros cuadrados (m^2) = 0.01 kilómetros cuadrados (km^2)

3.2 Comercio internacional de maderas

En las décadas de 1940 a 1970, los pinos tropicales originarios de México, Honduras, Guatemala, Nicaragua y el Caribe tenían importancia en los mercados regionales del Caribe, Centro y Sur América, pero en la actualidad son de poca importancia económica.

Aunque México es el país que más variedad de especies de pinos y coníferas tiene a nivel mundial (Martínez, 1963), desde hace muchos años es importador neto de productos de madera y celulosa. Hay plantaciones importantes de pinos tropicales en Brasil, Venezuela, Colombia, Kenia, Zimbabwe y Fiji. Sin embargo, a excepción del Brasil, la madera es utilizada principalmente para abastecer a los mercados locales y no es importante económicamente como mercancía internacional, aunque hay algunas pocas excepciones.

Existen otras especies de valor comercial proveniente de bosques naturales, pero no en cantidades industriales para la producción de madera comercial de mercados internacionales.

3.2.1 Maderas de zonas templadas

Las coníferas dominan los mercados de productos forestales internacionales de los países en la zona templada. Hay grandes exportaciones de madera en rollo, madera aserrada, madera astillada y de celulosa de Norte América y de Escandinavia. Durante los años cincuenta a ochenta, los bosques de abetos y pinos de Alaska fueron explotados en su totalidad para abastecer los mercados de Japón.

Las maderas de pino de Oregon o abeto-Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) se han utilizado para construcciones en Europa y Asia, además de Norte América.

Aunque todavía existen bosques naturales de esta especie, las trozas grandes como las que existían hace 50 años se han agotado. Buena parte de la madera proviene de bosques secundarios que se han levantado naturalmente después de grandes incendios y otros fenómenos naturales. El pino de Oregon también se planta ampliamente en el Pacífico Noroeste de los Estados Unidos, en el Norte de Europa y en la Isla Chiloé en el Sur de Chile.

Durante muchos años, las maderas de pino ponderosa (*Pinus ponderosae*) fueron las más cotizadas para la producción de molduras, marcos de ventanas y puertas. Es una madera suave y estable para tales productos y, además, el árbol en pie tiene alta resistencia a los fuegos, comunes en el oeste de Norte América. Sin embargo, los árboles grandes de pino ponderosa se han acabado y en el presente es una madera escasa en los depósitos de materiales de construcción. El pino ponderosa no se está plantando ampliamente debido a su lento crecimiento y a los ataques de una planta parásita, muérdago enano, la cual es una plaga que mata tanto a los árboles grandes como a los pequeños.

Las especies de pino blanco de Norte América (*Pinus strobus*, *P. lambertiana*, *P. monticola*) fueron explotadas durante los siglos diecinueve y veinte. Durante la gran expansión norteamericana hacia el oeste, los grandes bosques de pino blanco en Minnesota y Michigan fueron explotados para suministrar material para la construcción de las ciudades del viejo oeste como Dodge City, Virginia City y Kansas City. La madera del pino blanco también fue importante para la producción de molduras, marcos de ventanas y puertas durante el siglo veinte, pero ya no existe en el mercado. El pino blanco no se planta a escala comercial debido a su susceptibilidad al ataque de hongos e insectos que lo afectan tanto en bosques naturales como en plantaciones.

3.2.2 Maderas finas

Las maderas finas tropicales también se están acabando. Aunque la caoba (*Swietenia sp*) y el cedro rojo (*Cedrela sp*) son especies originarias de casi toda la América Tropical, en la actualidad estas maderas son muy escasas. La última fuente importante de árboles grandes de caoba está en la región amazónica de Santa Cruz, Bolivia, y en estos momentos está bajo una intensa explotación. Hace muchos años en el mercado de Colombia se reemplazó el cedro por otras especies, notablemente la Ceiba roja o Ceiba tolúa (*Pachira o Bombacopsis quintana*), la cual tiene un aspecto algo similar al cedro. Las especies de caoba de África (*Khaya sp*) y cedro de Asia (*Toona ciliata*) también se están acabando rápidamente en los bosques naturales. Aunque se han hecho muchos ensayos para establecer plantaciones, los cedros y las caobas no se están plantando a nivel comercial, aunque hay algunas pocas excepciones, debido a su susceptibilidad al ataque por los insectos barrenadores *Hypsipylla sp*. El barrenador generalmente no mata el árbol, pero causa su bifurcación originando crecimientos en forma torcida.

Las maderas de palo de rosa (*Dalbergia sp*) se acabaron hace años y fueron reemplazadas en el comercio por maderas del género *Pterocarpus sp*. El palo de rosa se planta en pequeña escala en el Sur de Asia, principalmente en Pakistán e India, pero con turnos muy largos, hasta 80 años. Debido a su lento crecimiento y su tendencia a bifurcarse, la producción de madera comercial de palo de rosa en plantaciones es baja.

El nogal negro (*Juglans nigra* y *J. neotropica*), el nogal blanco (*Juglans cinerea*) y el nogal cafetero o laurel (*Cordia alliadora*) son maderas finas muy escasas y muy cotizadas para muebles. En Norteamérica se ha tratado de plantar el nogal negro y el nogal blanco, pero sin éxito, debido a los problemas que ocurren por la pudrición de las raíces, su lento crecimiento y su exigencia en cuanto a calidad del sitio. El nogal cafetero se ha plantado en Colombia y Costa Rica como sombra para el café, pero no ha resultado promisorio en plantaciones para la producción

de madera, debido a su tendencia a bifurcarse y a su crecimiento relativamente lento.

Durante el siglo veinte, se vio la caída de los mercados de muchas especies importantes en Norte América, incluyendo el castaño (*Castanea dentada*) y el olmo (*Ulmus americana*) especies de mucha importancia en la industria de la construcción y de muebles. Estas especies fueron azotadas por enfermedades introducidas de Europa y Asia. El castaño y el olmo ya no tienen importancia en los mercados, aunque las especies todavía existen en los bosques naturales de Norte América.

Los robles de Norte América y Europa (*Quercus sp*) y los de Centro América y Sur América tropical (*Quercus sp.*, *Tabebuia sp.*) y los de Chile y Argentina (*Nothofagus sp*), son importantes en los mercados internacionales para la producción de paneles decorativos, pisos y muebles. Aunque hay muchas especies de robles, sus maderas son similares en textura y calidad. No se plantan los robles a escala comercial a causa de su lento crecimiento. No obstante, todavía hay disponibilidad de madera de roble en Norte América, Europa y en Chile, debido a la regeneración natural de estas especies en los bosques naturales.

La teca (*Tectona grandis*) es originaria del Sur de Asia. Es una madera muy fina utilizada en yates para navegación marítima, en paneles decorativos, en muebles y en artesanías trabajadas en madera. La última fuente importante de la teca natural está en Myanmar (Birmania), pero se está acabando rápidamente debido a la tala de aproximadamente 600 mil metros cúbicos por año.

De todas las especies en el mundo conocidas por sus maderas finas, la teca es la única que se maneja en plantaciones comerciales a gran escala. Según la información de la FAO, había 5,7 millones de hectáreas de teca plantada en el mundo en el año 2000, la gran mayoría de ellas se efectuó en Asia. A pesar de ser

una especie de larga vida, su tasa de crecimiento (el incremento medio anual) se maximiza en plantaciones jóvenes, entre los 9 y 12 años de edad. Es decir, es una especie con una tasa de crecimiento similar a muchas especies de pinos tropicales. Además, es una especie que tiene una corteza gruesa que la protege contra los incendios al igual que ocurre con muchos pinos tropicales.

Aunque la teca se maneja en la India con turnos de más de 100 años y en Indonesia con turnos de entre 40 y 80 años, el crecimiento de la teca permite la producción de trozas para aserrío con turnos de entre 20 y 25 años en los sitios adecuados para su desarrollo (Miller, 1969).

Cuadro 2. Estimación de la producción de madera por sectores en los 10 mayores productores del mundo (miles de m³)

Tableros de madera maciza		Tableros de contrachapado		Tableros de partículas		Tableros de fibras	
País	Volumen	País	Volumen	País	Volumen	País	Volumen
EE.UU.	109.800	EE.UU.	18.771	Alemania	7.109	EE.UU.	6.438
Antigua URSS	105.000	Indonesia	7.435	EE.UU.	6.877	Antigua URSS	4.160
Canadá	54.906	Japón	6.415	Antigua URSS	6.397	China	1.209
Japón	29.781	Canadá	1.971	Canadá	3.112	Japón	923
China	23.160	Antigua URSS	1.744	Italia	3.050	Canadá	774
India	17.460	Malasia	1.363	Francia	2.464	Brasil	698
Brasil	17.179	Brasil	1.300	Belgica-Luxemburgo	2.222	Polonia	501
Alemania	14.726	China	1.272	España	1.790	Alemania	499
Suecia	12.018	Corea	1.124	Austria	1.529	Nueva Zelanda	443
Francia	10.960	Finlandia	643	Reino Unido	1.517	España	430
Mundial	505.468	Mundial	47.814	Mundial	50.388	Mundial	20.248

Fuente: FAO 1993.

3.3. Importancia del recurso forestal en México

3.3.1 Superficie forestal Mexicana

México posee una gran diversidad de bosques y selvas que representan el 33% del territorio total. Estos bosques tienen un alto valor de biodiversidad, producen numerosos beneficios económicos y son críticos para el bienestar de muchas

comunidades, 2depositarias de conocimientos ancestrales sobre sus recursos naturales.

Los bosques templados de pino, encino y oyamel generalmente se encuentran en la parte alta de las montañas. México es centro de diversidad tanto de pinos como de encinos con más del 50% de todas las especies de pino y más de 150 especies de encinos del mundo. En estos bosques habitan una gran cantidad de especies animales, entre las que sobresalen el oso negro, la cotorra serrana y la mariposa monarca.

Los bosques nublados se encuentran en zonas con gran cantidad de lluvia en la parte media de las montañas. Actualmente están muy restringidos. Son característicos de estos bosques los helechos arborescentes, plantas epifitas, aves como el quetzal entre otras especies de flora y fauna autóctonas.

Las selvas tropicales secas se distribuyen en las partes bajas. Contienen gran cantidad de especies endémicas y son el hábitat del jaguar, la iguana, el monstruo de gila y la guacamaya verde. La selva tropical húmeda ha desaparecido de las planicies costeras, reduciéndose a un 10% de su extensión original. En este complejo y diverso ecosistema habitan el tapir, los monos araña y aullador, gran variedad de pericos y tucanes y la imponente águila arpía. Sin embargo, los bosques y selvas se están perdiendo a una velocidad alarmante. La tasa anual de pérdida de bosques y selvas en México ha sido estimada entre 300,000 y 1,500,000 hectáreas. (SEMARNAT, 2002)

Las áreas forestales deben ser valoradas con base en las múltiples funciones ambientales, sociales y económicas que cubren y que son fundamentales para el país, sus regiones y comunidades.

3.3.2 Estado actual de las áreas forestales en México

El 80% de la superficie forestal nacional se encuentra bajo el régimen de propiedad social y con una población aproximada de 10 millones de habitantes que son dueños del 80% de los recursos forestales del país; 15% es privada y pertenece a pequeños propietarios con bosques de menos de 20 hectáreas, y 5% son terrenos nacionales. La propiedad social integra comunidades y ejidos en la que aproximadamente más de 27% habla alguna lengua indígena.

Las comunidades y ejidos, por la similitud en sus características de organización, pueden ser consideradas dentro de un mismo grupo. De ellas, 8,417 que representan 28% del total de las comunidades rurales del país (29,983) poseen recursos forestales. Sólo en 421 ejidos y comunidades la actividad forestal constituye el principal sustento económico, y la mayoría de éstos se concentra en Chihuahua (99) y Durango (122).

3.3.3 Principales especies forestales mexicanas

México se ubica dentro de los 12 países megadiversos, albergando 70 % de la biodiversidad del planeta. Respecto a las coníferas (destacando el género *Pinus*) se registran un total de 71 especies, de las cuales 50% de ellas son endémicas, lo que representa el 48% del total de especies conocidas en el mundo, colocando a México en el primer lugar del mundo en cuanto a riqueza de especies de pino. De igual forma sucede con los encinos, de las 135 especies reportadas para México, 115 son endémicas lo que hace un 70% del total de las especies reconocidas mundialmente.

México dispone de un bajo nivel de aprovechamiento forestal, de los 21 millones de hectáreas con potencial, sólo la cuarta parte aproximadamente, se encuentra bajo aprovechamiento.

Tal situación se debe principalmente a los bajos niveles de eficiencia y productividad, lo que conlleva una reducida presencia en el producto interno bruto nacional, aunado a las dificultades existentes para incrementar la competitividad, al no disponer de infraestructura y apoyos necesarios, se suma la falta de mercados diversificados y el grave deterioro que causan los incendios, las plagas y las talas masivas ilegales.

Por estados, el 81% de la producción forestal se localizó en cinco entidades federativas: Durango (31%), Chihuahua (21%), Michoacán (17%), Oaxaca (7%) y Jalisco (6%).

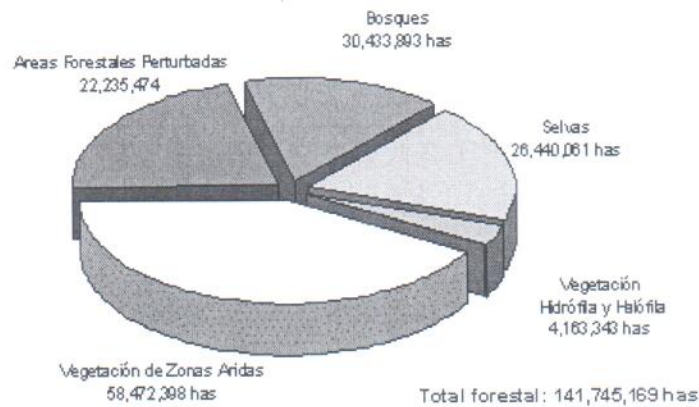
La mayor producción forestal corresponde a las coníferas (especies de pino principalmente) con el 88% del total, seguida de las latifoliadas (sobre todo el encino), con el 8% y de las maderas preciosas y comunes tropicales con un 4%.

Los productos no maderables se obtienen mediante procesos de recolección y en algunas zonas marginales constituyen la única fuente de ingresos para la mayoría de la población; la mayor parte de estos productos (candelilla, lechuguilla, yuca, orégano, pimienta, palma, entre otros) proceden de las regiones de Baja California, Coahuila, Zacatecas, Michoacán, Puebla, Veracruz y Chiapas.

3.3.4. Áreas potenciales para ser utilizadas con recursos forestales

De acuerdo al último inventario forestal realizado en el país en 1994, la superficie forestal existente en el territorio está ocupada por la vegetación de zonas áridas (arbustos y matorrales); en segundo lugar, las áreas forestales perturbadas; después, por los bosques (coníferas, coníferas/latifoliadas y latifoliadas) seguido por las selvas (selvas altas y medianas, selvas bajas y otras asociaciones) y por último, a la vegetación hidrófila y halófila.

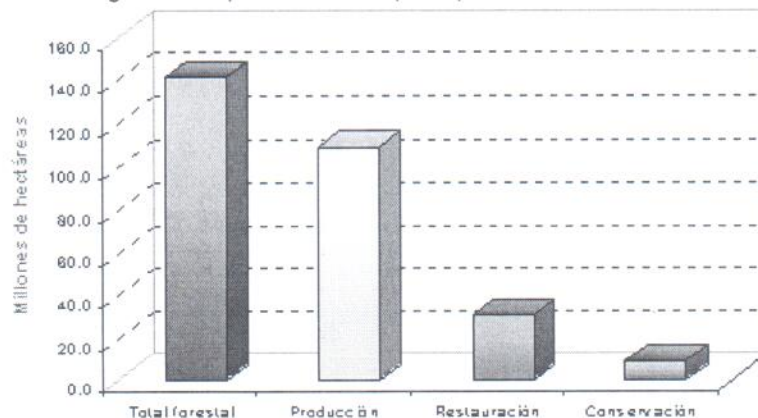
Figura 1. Superficie total forestal por ecosistema



La superficie forestal del territorio nacional está formada por 141 millones 745 mil 169 hectáreas y de acuerdo a sus características naturales actuales; para orientar el uso y manejo más apropiado del recurso forestal se clasifica en zonas de producción, restauración y conservación.

La primera se refiere a aquellos terrenos que tienen condiciones de vegetación y suelo apropiadas para la producción de madera y otros productos no maderables en forma sostenida a largo plazo. La segunda son terrenos de aptitud preferentemente forestal dedicados a otros usos, o que están en proceso de degradación por incendios, plagas y otros factores y la tercera, se refiere a las áreas naturales protegidas declaradas legalmente en el país.

Figura 2. Superficie de las principales zonas forestales



3.4. Situación del género *Pseudotsuga* en México

En México el género *Pseudotsuga* ha sido poco estudiado y en gran medida relegado, principalmente en los aspectos relacionados con su biología. En países como Estados Unidos y Canadá, *Pseudotsuga* es uno de los géneros de coníferas económicamente más importantes y es el más utilizado como árbol de navidad; en México anualmente se importan al rededor de 2 millones de árboles con este propósito.

Es urgente hacer algo para rescatar las áreas de bosque de *Pseudotsuga* que han disminuido a ritmos acelerados en nuestro país, principalmente por la tala indiscriminada y la apertura de nuevas tierras para cultivos agrícolas anuales, así como la depredación de conos y semillas por insectos y otros animales (Zavala y Méndez, 1996)

Ante tal situación, el género *Pseudotsuga* se encuentra seriamente amenazado, las poblaciones están más limitadas para producir semilla; ante tal situación se disipa un importante recurso genético lo que obliga a la búsqueda de estrategias que preserven el potencial evolutivo de *Pseudotsuga*, tales como fomentar la creación de huertos semilleros, micropropagando la especie, estableciendo plantaciones para la producción de árboles de navidad, con todos los beneficios ecológicos y económicos que se generan, así como las aplicación de técnicas silvícolas necesarias para la preservación y mejora de las poblaciones del género.

3.4.1. Distribución

El género *Pseudotsuga* presenta una distribución disyunta entre el norte de América y el este de Asia, considerándose al estado mexicano de Coahuila como el centro de origen (Figura 1), basándose en el registro fósil más antiguo que se conoce (Contreras *et al.*, 2001).

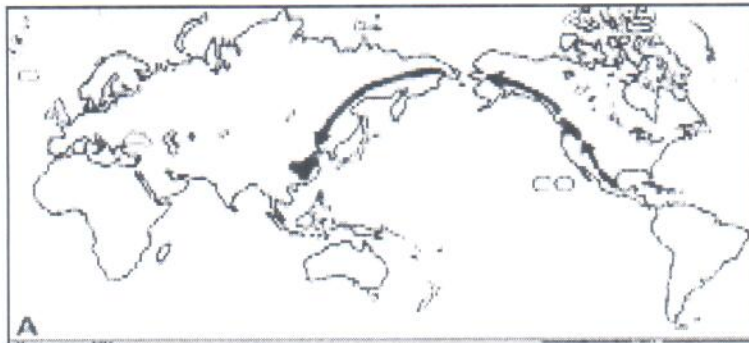


Figura 3. Centro de Origen (CO) y rutas de dispersión del género *Pseudotsuga*.

Pseudotsuga es una de las coníferas más importantes del mundo por su amplia distribución, por la superficie plantada en varios países y por su valor económico. En América la distribución natural de la especie es muy amplia. En la costa del Pacífico se extiende desde los 55° de latitud norte en Columbia Británica y Alberta en Canadá, hasta el norte de California en Estados Unidos de América; en las Montañas Rocallosas, desde la parte central de la Columbia Británica hasta el sur de Estados Unidos (Fowells, 1965).

En México, la distribución natural comprende los estados de Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Zacatecas en la Sierra Madre Occidental; en la Sierra Madre Oriental en Nuevo León y Tamaulipas. En la región central del país *Pseudotsuga* se encuentra en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Domínguez, 1986). En la Sierra Madre de Oaxaca, al sur de México, alcanza el límite mundial más septentrional a los 17°01' 05" de latitud norte (Acevedo, 1998).

La mayoría de las poblaciones de *Pseudotsuga* conocidas en México, particularmente en el centro del País ocupan pequeñas superficies aisladas, sumamente fragmentadas y sujetas a una fuerte presión antrópica, existen indicios paleobotánicos que en el pasado geológico de México este género tenía una distribución más amplia, ocupando vastas extensiones en la actual cuenca de Sabinas, Coahuila, en el Valle de México y norte de Chiapas. (Rzedowski *et al.*, 1977)

3.4.2. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Rzedowsky (2001) *Pseudotsuga macrolepis* Flous se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae
División Pinophyta
Clase: Pinopsida
Orden: Coníferas
Familia: Pinaceae
Género: *Pseudotsuga*
Especie: *macrolepis*

3.4.3. Características morfológicas de la especie *Pseudotsuga macrolepis* Flous

La especie *Pseudotsuga macrolepis* F. es un árbol de 12 a 15 m de altura; diámetro de 35 a 50cm, ramas subverticiladas irregularmente dispuestas, las inferiores extendidas y las superiores ligeramente levantadas, formando una copa irregular no rala. Ramillas alternas en algunos casos opuestas de color rojizo cerca de la extremidad, la superficie es hirsuta con pubescencia esparcida y corta.

3.4.4. Corteza

En árboles jóvenes es gris, delgada, suave y cubierta de bolsas de resina. En el árbol adulto maduro se torna café-rojizo, gruesa, esponjosa, agrietada, áspera, escamosa y con un espesor que puede llegar a 10 cm o más.



Figura 4. Aspecto de la corteza de *Pseudotsuga*

3.4.5. Hojas

Son acículas (hojas) delgadas, lineales, planas y obtusas en el ápice, o agudas en los brotes primarios, blandas y flexibles, de color verde-amarillento, verde oscuro o verde azuladas, de 1.5 a 5.5 cm de longitud, de 1.5 cm de ancho; las yemas son largas ovoides de 5.5 a 7 cm de largo, algunas veces hasta 8 cm por 3.5 a 4 cm de diámetro



Figura 5. Acículas del último periodo vegetativo de *Pseudotsuga*

3.4.6. Flor

Conífera diclino o monoica. Los amentos masculinos crecen lateralmente en las ramas en la parte inferior de éstas y son de color verde-amarillo o anaranjado a la floración. Los conos femeninos son péndulos oval a ovados, cilíndricos, de color café, delgadas y ocasionalmente algo alargadas en el ápice, más largas que anchas.

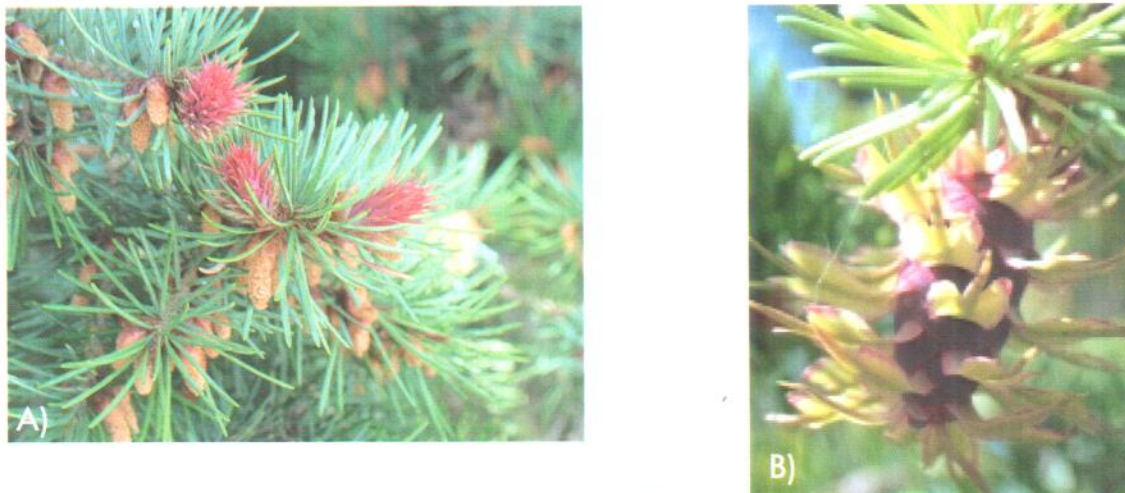


Figura 6. A) Flor masculina B) Flor femenina

3.4.7. Fruto

Son conos de 35 a 180 mm de largo por 30 a 70 mm de ancho, nacen en posición terminal de pequeñas ramillas, tienen numerosas y características escamas trífidas (estériles o téctriles).



Figura 7. Fruto de *Pseudotsuga*

3.4.8. Madera

Posee albura de color amarillo-claro y duramen amarillo-ocre a ligeramente rosado, con brillo mediano, olor ligeramente aromático (resina), textura fina y homogénea, de grano derecho y veteado pronunciado. Anillos anuales bien visibles con un alto porcentaje de madera tardía (madera de verano). Rayos

medulares bien visibles y muy numerosos. El leño tardío es muy abundante, de color café-rojizo. Madera que se puede clasificar entre liviana y medianamente liviana y de dureza intermedia. Es poco durable en contacto con el suelo.

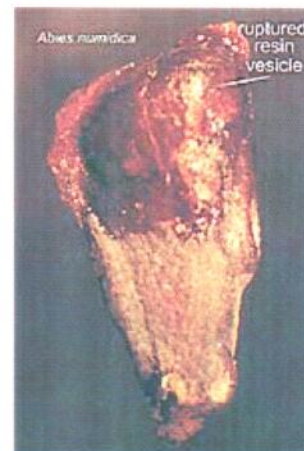
3.4.9. Semilla

Ligeramente ovoide o subtriangular de 5 a 7mm de largo por 3 a 4mm de ancho, aplanada en cara y convexa en la parte que queda envuelta por la base del ala, color café opaco en la cara plana y castaño en la convexa, ala de 15 a 16mm de largo incluyendo la semilla. Es un árbol perennifolio, florece de abril a mayo y el polen se disemina de mayo a abril. De agosto a septiembre se pueden encontrar los conos maduros de sus frutos. Generalmente la producción abundante de conos ocurre cada 4 ó 6 años. La diseminación de la semilla es por viento.

El embrión esta constituido por un verticilo de cotiledones u hojas embrionarias, 4 a 12, los cotiledones rodean la estructura cónica formada por un tejido meristemático llamado pluma o epicótilo, esta estructura da origen al tallo de la plántula y a las hojas primarias. El hipocotilo es la región de transición entre tallo y raíz, en la región inferior se localiza la radícula, la cual esta formada por tejido meristemático (Niembro, 1986).



Figura 8. Semilla de *Pseudotsuga*



3.4.10. Hábitat

Pseudotsuga macrolepis Flous, se reproduce mejor en altitudes de 2 mil 800 metros sobre el nivel del mar, mínima de mil 500 y máxima de 3 mil 600.

Los suelos según la clasificación de la FAO que son propicios para plantar o sembrar este árbol son: Regozol, Feozem, Leptosol, Cambisol. Esta especie se establece sobre suelos jóvenes, en laderas con pendientes de 20 a 70 por ciento y con exposición norte, noroeste y noreste, prefiriendo las primeras. Se adapta a una gran variedad de suelos, aunque aquellos que presentan altos contenidos de Nitrógeno y buena porosidad son los preferidos.

El clima adecuado para la especie es de bosques templado frío subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura promedio mínima de 4.5° centígrados, media anual de 13°centígrados y temperatura promedio máxima de 22° centígrados. Tolerancia a una precipitación mínima de 600 milímetros, una media de 1,200 y una máxima de 1,800 mm.

Se le encuentra en superficies muy reducidas y se desarrolla en sitios sombríos y húmedos, preferentemente viven en laderas de cañadas, barrancas o valles muy protegidos.

Presenta raíces poco profundas por lo que se debe procurar plantarlo en lugares protegidos del viento; es medianamente tolerante a la sequía.

3.4.11. Plagas y enfermedades de *Pseudotsuga* en México

En todas las áreas de distribución natural de *Pseudotsuga* en México así como en las zonas con plantaciones se encuentra el patógeno Tizón Suizo *Phaeocryptopus gaeumanii*, infectando árboles de todos tamaños. La infección se presenta en

acículas de todas edades, el follaje puede estar verde a verde amarillento y eventualmente café; la caída prematura de acículas comienza en el follaje más viejo y en ataques severos el follaje joven también se puede desprender.

Cancro resinoso por *Fusarium circinatum*. Es un hongo de gran importancia en plantaciones comerciales en el Estado de México, los árboles infectados por el hongo muestran exudaciones de resina en la corteza de troncos, los árboles infectados presentan un aspecto marchito con ramas de color rojizo, al avanzar la infección, causa la muerte del árbol (Cibrián *et al.*, 2007).

Las semillas y conos son atacados por insectos tales como *Pityophthonis orarius*, *Critonia oregonensis*, *C. washigtoensis*, *Comptomyia pseudotsugae* y *Barbara colfoxiana*, entre otros. Larvas de *Barbara* sp. infestan los conos y se pueden comer las semillas, se considera que esta plaga tiene un impacto negativo en la regeneración natural de un árbol hospedero, y es una limitante en la obtención de semillas; se han registrado infestaciones severas de esta especie en Coahuila y Tlaxcala, en donde destruyeron más del 90% de los conos. Las larvas de *Choristoneura* (Tortricidae) atacan los conos desarrollados, alimentándose desde el exterior, alimentándose igualmente del follaje (Cibrián *et al.*, 1986).

Respecto al ataque por insectos de árboles jóvenes y maduros se encuentra el descortezador *Dendroctonus pseudotsugae*, atacando y matando árboles en grandes volúmenes. *Rhabdodine pseudotsugae*, es un insecto que causa daños al follaje, provocando grandes pérdidas del arbolado.

Los muérdagos enanos son patógenos que parasitan especies del género *Pseudotsuga*. *Arceuthobium douglasii* tiene como hospedante árboles de la especie, propiciando la pérdida de vigor, ocasionando mayor susceptibilidad al ataque de otras plagas y enfermedades.

3.5 Propagación forestal *in vitro*

Las especies forestales principalmente las coníferas pueden ser propagadas en forma económica a través de semillas.

Los programas de mejoramiento genético convencionales en estas especies consumen mucho tiempo, ya que para las coníferas la primera fase se requiere que los árboles madre inicien la producción de semillas para posteriormente realizar fecundaciones controladas o libres, esperar la producción de semilla, producir nuevamente planta, esperar que dicha planta originada de la primera fase, proveniente de huertos semilleros alcance la madurez, realizar la correspondiente polinización y nuevamente obtener semilla y así sucesivamente, de acuerdo a los objetivos del programa de mejoramiento que se este llevando a cabo.

Los bosques de coníferas son muy heterogéneos ya que la semilla de individuos sobresalientes no necesariamente da origen a una progenie mejorada.

La semilla artificial ofrece la posibilidad de clonar aquellos árboles sobresalientes a costos razonables y en un tiempo mínimo.

Los beneficios potenciales de la biotecnología son aún mayores en silvicultura que en agricultura, ya que en la mayoría de los casos, da la posibilidad de ganar tiempo en los procesos de mejoramiento de especies forestales, mediante la clonación de individuos genéticamente superiores, atendiendo problemas de producción y rendimiento de semillas, materias primas maderables y de otros productos, dificultades con los que se enfrentan los silvicultores por la necesidad de obtener la mayor cantidad de materias forestales en turnos más cortos y en áreas cada vez más compactas y con problemas de erosión y bajos rendimientos tal como en la agricultura.

La biotecnología utilizada como herramienta en programas de mejoramiento de especies forestales se puede resumir en las siguientes categorías: **almacenamiento *in vitro* y crioconservación**, esta técnica consiste en el mantenimiento de células, tejidos u órganos en cultivos, los cuales reducen la velocidad de crecimiento manipulando luz, temperatura o nutrientes o mediante la suspensión en nitrógeno líquido.

Utilización de marcadores moleculares. Esta técnica implica la identificación mediante reacciones bioquímicas muy perfeccionadas de las variaciones moleculares celulares como el DNA y las proteínas, contrariamente a las características fenotípicas de los individuos de estudio, los marcadores moleculares ofrecen la ventaja de que no cambian por efecto del medio ambiente, si no por la fase de desarrollo de la planta.

Ingeniería genética. Consiste en la inserción y expresión de nuevos genes en una planta o la modificación del genoma existente mediante la manipulación del DNA, La transformación de nuevas especies con genes disponibles, constituirá un importante logro en la biotecnología.

El cultivo *in vitro* puede definirse como “El cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores”.

3.5.1 Embriogénesis *in vitro*

El proceso de embriogénesis somática comienza con una fase de inducción, en la que se obtienen uno o varios embriones. Éstos se multiplican velozmente y de forma constante, dando lugar a miles de ellos. Se inicia entonces la fase de maduración-germinación-conversión en planta, en la que hay que lograr parar el

proceso recurrente para que cada embrión individual se comporte como una auténtica semilla y germine para dar lugar a una planta.

La multiplicación mediante embriogénesis somática es tan eficiente que como ejemplo, a partir de un embrión somático de alfalfa podrían producirse más de 2 cuatrillones de embriones somáticos.

La dificultad más importante en este momento, es que no se conocen bien cuáles son los estímulos que llevan a una o varias células a sufrir esta "reprogramación", algo que la genómica está tratando de exponer. Por ello, y a pesar de que la embriogénesis somática se ha logrado en cientos de especies vegetales, conseguirlo con una nueva especie, y sobre todo con árboles centenarios, es siempre complejo. A esto hay que añadir que, el costo de producir "árboles clónicos" es más elevado que el de árboles producidos de manera convencional por semillas, lo que frena su aplicación industrial.

Hoy en día la micropropagación *in vitro*, a través de la embriogénesis somática es una de las principales técnicas de propagación vegetativa para algunos árboles de interés comercial, se han logrado avances en especies recalcitrantes, extendiéndose al cultivo de embriones, germinación de semillas, clonación, producción de plantas libres de enfermedades, micropropagación, variación somaclonal, inducción de háploides, manipulación genética, etc.

Sin embargo en coníferas es difícil la regeneración de plantas viables, cuando es a partir de protoplastos, y la forma principal de regenerar *in vitro* es la embriogénesis.

La embriogénesis somática es una técnica biotecnológica de propagación de plantas que permite obtener embrioides a partir de células somáticas desde cualquier tipo de tejido.

Merkle y Dean 2000, señalan que en el proceso de embriogénesis somática, al no haber fusión de gametos, no existe combinación genética, por tanto el embriode generado en un clon cien por ciento idéntico al árbol madre o donador de tejidos.

Diversos autores han manifestado que la regeneración de plantas por embriogénesis somática es una vía menos expuesta a generar variación genética, debido a que su consecución implica la expresión de muchos genes, y cualquier alteración en los mismos haría inviable el proceso (Celestino *et al.*, 2005).

Mediante el empleo de promotores y reguladores de crecimiento, se promueve el desarrollo de células hacia otra función, formando conjunto de masas celulares desorganizadas llamadas callo, las cuales a través de cambios hormonales aplicados a los medios de cultivo estimulan la formación de estos grupos celulares

Murashige (1977), menciona que la embriogénesis somática no es definida, solamente se ha logrado acelerarla o en su caso retardarla, debido a que su inducción no envuelve directamente suplementación hormonal.

La influencia de factores que controlan la iniciación de embriones asexuales, tal vez inóculos y ciertas cualidades fisiológicas asociadas con ellos sean más significativos, comúnmente se han utilizado estructuras reproductivas como partes florales, óvulos fertilizados y no fertilizados, embriones cigóticos, endospermo, anteras y macrosporas, así como inóculos de tejidos vegetativos como ápices, secciones de hipocotilo y mesocotilo, raíz, etc., los cuales vez producen embriones de forma directa (Tisserat *et al.*, 1979).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

El proyecto presentado, se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo Estado de México.

4.2 Procedencia del material vegetal

El material vegetal empleado, consistente en semillas, para la realización de este trabajo fue donado por la empresa Agros Navidad S.A. de C.V. procedente del rodal ubicado en Terrenate, Estado de Tlaxcala a los 19°31'12" latitud norte y longitud oeste a los 97°54'58" con una altura de 2950 msnm.

4.3 Desinfestación de material vegetal

Las semillas empleadas para el desarrollo del experimento fueron tratadas para disminuir la contaminación en condiciones *in vitro*. La desinfestación del material consistió de las siguientes acciones: Se limpió la semilla, retirando las impurezas presentes, se procedió a lavarlas vigorosamente con detergente líquido Tween 80 y agua, posteriormente se enjuagaron con agua destilada, una vez eliminado el detergente, se suspendieron las semillas en hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) al 4% durante 15 minutos, se escurrieron, se enjuagaron en agua oxigenada; se colocaron en un recipiente esterilizado en una solución de agua oxigenada y fungicida sistémico al 0.1% durante 24 horas en agitación (agitador rotatorio shaker) a 50 rpm.

4.4 Medio de cultivo

4.4.1. Medio para promover la iniciación de callos embrionógicos

El medio empleado para este propósito fue el medio básico MS (1962), la inducción de callos se logró con dos tratamientos, que se describen a continuación:

Tratamiento 1 (CE1). Se incorporaron las fuentes de amonio a un 25% y las fuentes de nitratos a un 75%, el resto de las sales se incorporaron normalmente al 100%, con 3% de sacarosa y 7% de agar, las vitaminas normales incluyendo:

Fuente	Dosis
Myo-inositol	100 mg.L ⁻¹
Tiamina	0.40 mg.L ⁻¹
Piridoxina	60 mg.L ⁻¹
2,4-D	8.0 mg.L ⁻¹
BA	4.0 mg.L ⁻¹
Kinetina	4.0 mg.L ⁻¹
Caseína hidrolizada	500 mg.L ⁻¹
L-glutamina	500 mg.L ⁻¹

Tratamiento 2 (CE2). Disminución de nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa.

Fuente	Dosis
Tiamina	40 mg.L ⁻¹
2,4-D	3.0 mg.L ⁻¹
BA	1.0 mg.L ⁻¹
Caseína hidrolizada	100 mg.L ⁻¹

Ambos tratamientos fueron probados adicionando carbón activado al 1%.

4.4.2. Medio para inducir la embriogénesis somática

Para inducir la formación de embriones a partir de callos cultivados, se probaron dos tratamientos con cuatro variaciones.

El primero el **Medio de Proliferación (MP)** con los siguientes compuestos: medio básico MS (1962), disminuyendo los nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa y los siguientes complementos:

Fuente	Dosis
Tiamina	40 mg.L ⁻¹
2,4-D	3.0 mg.L ⁻¹
BA	1.0 mg.L ⁻¹
ABA	4.23 mg.L ⁻¹
PEG	7.5 gr.L ⁻¹
Caseína hidrolizada	100 mg.L ⁻¹

Este medio de proliferación fue probado con luz y oscuridad en medio sólido y en medio líquido.

El segundo tratamiento **Suspensión embriogénica (SE)** se compone de medio básico MS (1962), con las fuentes de amonio disminuidas al 25% y fuentes de nitratos al 75% con 7% de agar y 3% de sacarosa, complementado con:

Fuente	Dosis
Tiamina	40 mg.L ⁻¹
2,4-D	3.0 mg.L ⁻¹
BA	1.0 mg.L ⁻¹
ABA	4.23 mg.L ⁻¹
PEG	7.5 gr.L ⁻¹
Caseína hidrolizada	100 mg.L ⁻¹

De igual forma, el medio de suspensión embriogénica se probó en medio sólido y líquido con luz y oscuridad.

4.4.3. Medio para fomentar la diferenciación embriogénica

Para inducir la diferenciación de embriones a partir de callos cultivados, se probaron tres tratamientos, el **medio de diferenciación (DE)** se compone de medio básico MS (1962) y con vitaminas WS al 100%, los complementos y reguladores de crecimiento se describen a continuación:

Tratamiento	Glutamina	Caseína hidrolizada	Galactosa	2,4-D	BA	Kinetina
DE1	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	3 mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹	--
DE2	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	3%	1 mg.L ⁻¹	0.3mg.L ⁻¹	--
DE3	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	--	--	--
DE4	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	0.5 mg.L ⁻¹ 1	0.1 mg.L ⁻¹ 1	0.1 mg.L ⁻¹ 1
DE5	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	--	0.5 mg.L ⁻¹ 1	0.5 mg.L ⁻¹ 1

El tratamiento DE2 tiene disminuido el medio básico MS al 50%. La fuente de hidratos de carbono para el Desarrollo Embrionario (DE) se otorgo a través de la galactosa.

Nota: Para cada uno de los experimentos realizados en esta investigación se utilizaron frascos gerber con tapas plasticas, esterilizados por 45 minutos en autoclave a una temperatura de 121°C y 1.2kg/cm² de presión, solidificándose a temperatura ambiente.

4.5 Cultivo

El cultivo de embriones para la formación de callos embriogénicos así como el subcultivo de los mismos, fue realizado bajo condiciones asépticas en el área de siembra del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Fitotecnia de la UACh, dentro de la campana de flujo laminar, con microscopio estereoscópico, pinzas para disección, mango con bisturí, navajas número 11 y 24, cajas petri de cristal, mechero, alcohol al 70 y al 96%, agua esterilizada con antioxidantes, hipoclorito de calcio, algodón, cubre boca y cofia.

4.5.1 Cultivo de embriones cigóticos

Una vez realizada la desinfestación de las semillas, se colocaron dentro de la campana de flujo laminar en cajas petri con agua esterilizada con antioxidantes, con la ayuda del microscopio estereoscópico fueron disectadas hasta liberar el embrión del resto del material de reserva de la semilla para posteriormente con la ayuda de pinzas de disección introducirlo en el medio de cultivo en forma vertical, se colocaron cinco embriones por frasco.

Nota: fueron cultivados embriones completos y segmentados, sin embargo únicamente formaron callo los embriones completos.

4.5.2 Subcultivo de callos embriogénicos

El subcultivo de callos fue realizado dentro de la campana de flujo laminar, enjuagando a los callos el medio existente en cajas petri de cristal con agua esterilizada con antioxidantes. Cuando se presentaron áreas necrosadas en los callos fueron retiradas con bisturí y posteriormente fueron enjuagadas en agua esterilizada con antioxidantes, en ambos casos su colocaron en el medio profundizando aproximadamente 3 milímetros, cultivando cinco callos por frasco.

Se cultivaron callos completos y segmentados los cuales se desarrollaron de igual forma de acuerdo al tamaño de cada callo.

4.6 Incubación

Las semillas y callos empleadas en esta investigación se mantuvieron en el área de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Fitotecnia de la UACH, bajo condiciones controladas con una temperatura promedio constante de 27°C $\pm$ 1°C durante el día y una temperatura mínima promedio de 23°C durante la noche con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con lámparas fluorescentes de 75 wats.

Los frascos gerber con las semillas y callos respectivamente se colocaron en el nivel central del estante del lado izquierdo de la cámara de incubación bajo una intensidad luminosa promedio de 31 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de segundo.

Para la prueba correspondiente a la fase de oscuridad del medio de proliferación (MP) y suspensión embriogénica (SE) los frascos gerber que contenían los callos respectivos fueron colocados dentro de la incubadora Lab-line a una temperatura constante de 25°C, respecto a la fase líquida del mismo experimento se colocaron los frascos gerber tapados en su totalidad con papel aluminio en el agitador rotatorio shaker.

4.7 Evaluación del crecimiento de callos en medio MS (1962) con BA, 2,4-D y KIN

Evaluación del medio de cultivo para inducir la formación de callos embriogénicos (CE1 y CE2). Se evaluaron los embriones cigóticos que dieron origen a los callos embriogénicos durante 3 meses y medio tomando observaciones cada dos semanas. Las variables a evaluar fueron nivel de respuesta y nivel de necrosamiento.

Tratamiento	Medio MS (1962)		
	2,4-D mg.L ⁻¹	BA mg.L ⁻¹	Kinetina mg.L ⁻¹
T1	8 mg.L ⁻¹	4 mg.L ⁻¹	4 mg.L ⁻¹
T2	3 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	--

Cada uno de los tratamientos para este experimento tiene variaciones en las fuentes de nitratos, amonio y fosfatos, las cuales se describen en el apartado correspondiente a la elaboración de los medios de cultivo.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el paquete estadístico SAS, con un nivel de significancia del 99%.

4.7.1 Modelo estadístico

Por la naturaleza del experimento, se empleó un diseño completamente aleatorio, la unidad experimental fue un frasco, conteniendo cinco callos por frasco; el diseño consta de 2 tratamientos y 10 repeticiones, la variable evaluada fue el crecimiento del callo y nivel de necrosamiento. Cada tratamiento fue probado adicionando carbón activado al 1% al medio de cultivo, definido por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + e_{ij}$$

Para: $i = 1, 2, 3, \dots, t$; $j = 1, 2, 3, \dots, r$.

Y_{ij} : respuesta obtenida en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento.

t : número de tratamientos.

r : número de repeticiones.

μ : media general.

τ_j : efecto del j -ésimo tratamiento.

e_{ij} : error aleatorio, donde $e_{ij} \approx N(0, \sigma^2)$

4.8 Evaluación de la inducción de embriogénesis somática

Para evaluar la inducción de la embriogénesis somática, se evaluaron los tratamientos medio de proliferación (MP) y suspensión embriogénica (SE) en sus diferentes variantes, medio sólido y líquido con luz y con oscuridad respectivamente fueron evaluados por 50 días tomando datos cada dos semanas evaluándose el nivel de respuesta y el nivel de necrosamiento.

Los tratamientos son descritos a continuación:

Tratamiento	Medio MS (1962)		
	Nitratos	Fosfatos	Amonio
MP	50%	200%	100%
SE	75%	100%	25%

Los reguladores de crecimiento y complementos de ambos tratamientos son los mismos para el medio de proliferación y suspensión embriogénica, los cuales se describen en el apartado 4.4.2. Ambos tratamientos fueron probados en medio líquido y sólido, con luz y oscuridad, sin carbón activado y con carbón activado al 1%.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el paquete estadístico SAS, con un nivel de significancia del 99%.

4.8.1 Modelo estadístico

Para la interpretación estadística se empleó un diseño en bloques completos con tratamientos aleatorizados, el cual está definido por:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \tau_j + e_{ij}$$

Para: $i = 1, 2, 3, \dots, b$; $j = 1, 2, 3, \dots, t$

Y_{ij} : respuesta obtenida en el i -ésimo bloque del j -ésimo tratamiento.

b : número de bloques

t: número de tratamientos

μ : media general

β_i : efecto del i-ésimo bloque.

τ_j : efecto del j-ésimo tratamiento.

e_{ij} : error aleatorio, donde $e_{ij} \approx N(0, \sigma^2)$

4.9. Evaluación de la diferenciación embriogénica

Respecto a la evaluación de la diferenciación embriogénica, se evaluaron los cinco tratamientos DE por 60 días tomando datos cada dos semanas evaluándose el nivel de respuesta y de necrosamiento. Los tratamientos son descritos a continuación:

Tratamiento	Medio MS (1962)					
	Glutamina	Caseína hidrolizada	Galactosa	2,4-D	BA	Kinetina
Uno	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	3 mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹	--
Dos	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	3%	1 mg.L ⁻¹	0.3mg.L ⁻¹	--
Tres	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	--	--	--
Cuatro	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	0.5 mg.L ⁻¹ 1	0.1 mg.L ⁻¹ 1	0.1 mg.L ⁻¹ 1
Cinco	450 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	6%	--	0.5 mg.L ⁻¹ 1	0.5 mg.L ⁻¹ 1

La interpretación estadística se llevó a cabo con el paquete estadístico SAS, con un nivel de significancia del 99%.

4.9.1 Modelo estadístico

Para la interpretación estadística se empleó un diseño en bloques completos con tratamientos aleatorizados, el cual está definido por:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + \tau_j + e_{ij}$$

Para: $i = 1, 2, 3, \dots, b$; $j = 1, 2, 3, \dots, t$

Y_{ij} : respuesta obtenida en el i -ésimo bloque del j -ésimo tratamiento.

b : número de bloques

t : número de tratamientos

μ : media general

β_i : efecto del i -ésimo bloque.

τ_j : efecto del j -ésimo tratamiento.

e_{ij} : error aleatorio, donde $e_{ij} \approx N(0, \sigma^2)$

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Respuestas obtenidas a la iniciación de callos embriogénicos

La obtención de callos embriogénicos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, empleando embriones completos y fraccionados en los medios de cultivo para la iniciación de callos embriogénicos o primera fase: Tratamiento 1 (CE1). Con las fuentes de amonio al 25%, fuentes de nitratos a un 75%, resto de las sales normales al 100%, 3% de sacarosa, 7% de agar, Myo-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina 0.40 mg.L⁻¹, piridoxina 60 mg.L⁻¹, 2,4-D 8.0 mg.L⁻¹, BA 4.0 mg.L⁻¹, kinetina 4.0mg.L⁻¹, caseína hidrolizada 500 mg.L⁻¹ y L-glutamina 500 mg.L⁻¹ y Tratamiento 2 (CE2). Disminuyendo las fuentes de nitratos al 50%, aumentando las fuentes de fosfatos al 200%, 3% de sacarosa, 7% de agar, tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹; manifestaron un índice de germinación por debajo del 1% cuando los embriones se establecieron fraccionados y de 99% cuando se emplearon embriones completos, reconociendo que esta respuesta se manifestó debido a que el embrión como tal, ocupa más del 90% de la cavidad embrionaria (Mápula *et al.*, 2008), aunado a las condiciones de autofecundación, y cruzamiento de individuos relacionados genéticamente en las poblaciones de *Pseudotsuga* del centro de México, zona de donde procede el material empleado para esta investigación, se perdió la capacidad de germinación en el caso del material seccionado; por tal motivo se decidió emplear embriones completos y promover la formación de callos en los tratamientos.

El cultivo de embriones cigóticos en medio MS (1962) en los tratamientos 1 y 2 descritos anteriormente se incubó en condiciones de luz, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad probando los tratamientos con y sin carbón activado. Las respuestas de los embriones cigóticos a los estímulos de la tiamina, kinetina, BA y 2,4-D, contenidos en los tratamientos 1 y 2 para la iniciación de callos embriogénicos, se empezó a manifestar a los 15 días de haberse iniciado su incubación. Durante el desarrollo de la fase de formación de callos embriogénicos no se presentaron problemas de contaminación.

A la cuarta semana de haber iniciado su incubación los embriones cigóticos establecidos en los tratamientos 1 y 2 de iniciación de callos embriogénicos en su modalidad con carbón activado, comenzaron a morir, esta respuesta se atribuye a una inadecuada cantidad de carbón activado, 1 gramo por litro en el medio de cultivo, ocasionando la absorción de nutrientes por el carbón y la falta de disponibilidad para los callos que se encontraban en fase de multiplicación celular y crecimiento.

El análisis del material y toma de datos, se realizó bajo microscopio estereoscópico cada diez días para verificar el nivel de respuesta manifestado a los tratamientos 1 y 2 para la iniciación de callos embriogénicos, nivel de crecimiento, color y densidad de los callos así como niveles de necrosamiento y contaminación; al realizar el subcultivo en medios nuevos 1 y 2 respectivamente para continuar su crecimiento, se observó que el 95% de callos eran de consistencia compacta, lo cual indica que los tratamientos para la inducción de callos embriogénicos 1 (CE1) y 2 (CE2) tuvieron efectos deseados al inducir masas de células bien organizadas e interconectadas con elevada capacidad embriogénica y sólo un 5% de callos de células friables no embriogénicos con pocas conexiones intercelulares.

Estadísticamente no se encontraron diferencias entre los tratamientos para iniciar la formación de callos embriogénicos 1 y 2 ($P \leq 0.001$); Tratamiento 1 (CE1), con fuentes de amonio al 25%, fuentes de nitratos al 75%, resto de las sales normales al 100%, 3% de sacarosa, 7% de agar, Myo-inositol 100 mg.L^{-1} , tiamina 0.40 mg.L^{-1} , piridoxina 60 mg.L^{-1} , 2,4-D 8.0 mg.L^{-1} , BA 4.0 mg.L^{-1} , kinetina 4.0 mg.L^{-1} , caseína hidrolizada 500 mg.L^{-1} y L-glutamina 500 mg.L^{-1} y Tratamiento 2 (CE2), disminuyendo las fuentes de nitratos al 50%, aumentando las fuentes de fosfatos al 200%, 3% de sacarosa, 7% de agar, tiamina 40 mg.L^{-1} , 2,4-D 3.0 mg.L^{-1} , BA 1.0 mg.L^{-1} y caseína hidrolizada 100 mg.L^{-1} , en la iniciación de callos embriogénicos,

sin embargo el tratamiento 2 (CE2) cuya fuente de fosfato se aumentó al 200% y nitratos se disminuyeron al 50% generaron callos de mayor volumen (Figura 9).

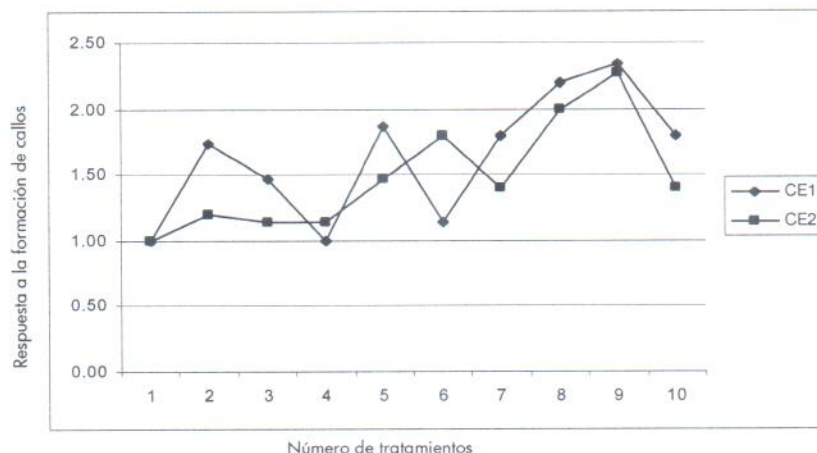


Figura 9. Obtención de callos embriogénicos a partir de embriones cultivados de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en los tratamientos 1(CE1). Con amonio al 25%, y nitratos a un 75%, las sales al 100%, 3% de sacarosa, 7% de agar, Myo-inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina 0.40 mg.L⁻¹, piridoxina 60 mg.L⁻¹, 2,4-D 8.0 mg.L⁻¹, BA 4.0 mg.L⁻¹, kinetina 4.0mg.L⁻¹, caseína hidrolizada 500 mg.L⁻¹ y L-glutamina 500 mg.L⁻¹ y 2 (CE2). nitratos al 50%, aumentando los fosfatos al 200%, 3% de sacarosa, 7% de agar, tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ a los 90 días.

El color de los agregados celulares para los tratamientos de inducción de callos embriogénicos CE1 y CE2 fue verde intenso en la mayoría de los casos, así como una de consistencia compacta, características típicas de la capacidad embriogénica de los callos embriogénicos cultivados *in vitro*.

En el tratamiento CE1 se manifestó una tonalidad verde-amarillo, color que se atribuye a la reducción al 75% las fuentes de nitratos.

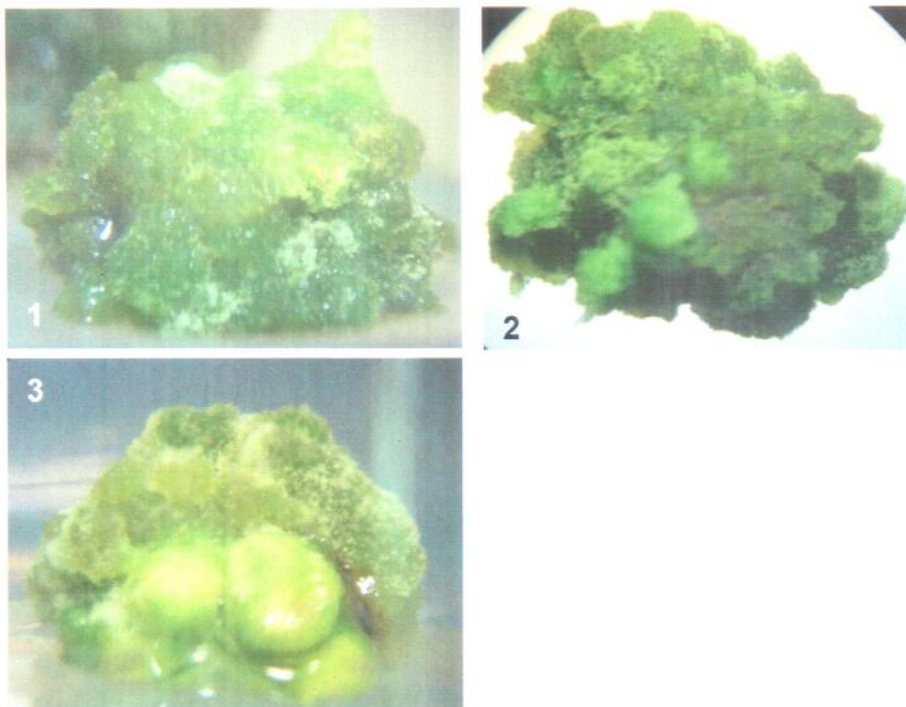


Figura 10. Etapas de crecimiento de los callos y de embriones somáticos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous durante 90 días en los tratamientos CE1 y CE2. Imagen 1. presenta crecimientos preliminares de tipo globular, 2 desarrollo de estructuras globulares o proembrionarias y 3 corresponde a la obtención de embriones maduros a partir de callos embriogénicos compactos.

5.2 Respuestas obtenidas a la inducción de la embriogénesis somática

Los callos obtenidos de la fase de iniciación de callos embriogénicos fueron establecidos en dos medios: Medio de proliferación (MP) compuesto de medio básico MS (1962), disminuyendo los nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ y el tratamiento suspensión embriogénica (SE) compuesto de medio básico MS (1962) con las fuentes de amonio disminuidas al 25%, fuentes de nitratos al 75%, con 3% de sacarosa, 7% de agar, suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹, ambos tratamientos fueron probados en medios sólidos y líquidos con luz y en oscuridad, con y sin incluir carbón activado en los medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados para la segunda fase de inducción de la embriogénesis somática en callos de la especie *Pseudotsuga macrolepis* Flous, denominada en esta investigación como fase de suspensión embriogénica (SE) y medio de proliferación (MP), resultó ser un factor importante para las respuestas embriogénicas de los callos obtenidos de la primera fase de iniciación embriogénica, donde destaca la disponibilidad de nitratos en el tratamiento suspensión embriogénica disminuida al 50%, y para el tratamiento medio de proliferación disminuida al 75% las fuentes de amonio reducidas al 25% aumentando la fuente de fosfatos al 200% con los reguladores de crecimiento en cantidades iguales para los dos tratamientos SE y MP, destacando el 2,4-D con 3.0 mg.L^{-1} , y la tiamina en dosis de 40 mg.L^{-1} , así como la aplicación *in vitro* de coadyuvantes como la caseína hidrolizada aplicada en 100 mg.L^{-1} en ambos tratamientos de inducción de la embriogénesis somática.

Para el caso de la fase experimental en medios líquidos con reguladores de crecimiento tiamina 40 mg.L^{-1} , 2,4-D 3.0 mg.L^{-1} , BA 1.0 mg.L^{-1} , con ABA 4.23 mg.L^{-1} , PEG 7.5 gr.L^{-1} y caseína hidrolizada 100 mg.L^{-1} , a partir de la segunda semana se comenzó a presentar necrosamiento en los callos, hasta perderse el total del material de ambos tratamientos de suspensión embriogénica SE y medio de proliferación MP, no obstante que los medios líquidos permiten una mayor disponibilidad de nutrientes y una mejor difusión de los metabolitos excretados; sin embargo, para el caso de los callos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous originados de la primera fase experimental o de iniciación, al tener una consistencia compacta, se asume iniciaron problemas en la aireación así como la vitrificación de los tejidos ocasionando la muerte a los callos (Celestino *et al.*, 2005).

La segunda fase de este experimento dio inicio con el total de los callos subcultivados a los tratamientos medio de proliferación MP y suspensión embriogénica SE que inició en medio sólido con reguladores de crecimiento, transfiriendo la parte que fue incubada inicialmente en oscuridad pasada a luz,

puesto que en dicho material presentó únicamente crecimientos de estructuras globulares no embriogénicas.

Al cabo de los 50 días que se sometieron los callos a los procesos de suspensión embriogénica y medio de proliferación, se obtuvieron callos cristalinos y mucilaginosos (Aitken y Connett, 1992), lo que nos indica que esta fase experimental generó callos embriogénicos; el efecto del ABA en los medios de cultivo detuvo los procesos de proliembrionía, lográndose inducir la formación de embriones somáticos y la transformación de los crecimientos globulares, asimismo el efecto del PEG 7.5 gr.L⁻¹ y la caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ en los tratamientos medio de proliferación MP y suspensión embriogénica SE contribuyó a la estabilización de los procesos de formación y maduración embriogénica.

Los datos generados del análisis de varianza indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para inducir la embriogénesis somática ($P \leq 0.001$); sin embargo en el caso de medio de proliferación (MP), compuesto de medio básico MS (1962), disminuyendo los nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ al cabo de 50 días cuyo medio de cultivo no contenía carbón activado, presentaron un mayor nivel de necrosamiento.

En el caso de los tratamientos de suspensión embriogénica (SE) el nivel de necrosamiento fue similar en su variación con carbón activado, compuesto de medio básico MS (1962) con las fuentes de amonio disminuidas al 25%, fuentes de nitratos al 75%, con 3% de sacarosa, 7% de agar, suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ (Figura11).

El peso seco de los callos obtenidos de esta fase experimental de un total de 35 callos por cada uno de los tratamientos, fue de 23.96 gramos para el tratamiento

de suspensión embriogénica (SE) compuesto de medio básico MS (1962) con las fuentes de amonio disminuidas al 25%, fuentes de nitratos al 75%, con 3% de sacarosa, 7% de agar, suplementado con tiamina 40 mg.L^{-1} , 2,4-D 3.0 mg.L^{-1} , BA 1.0 mg.L^{-1} , ÁBA 4.23 mg.L^{-1} , PEG 7.5 gr.L^{-1} y caseína hidrolizada 100 mg.L^{-1} y de 17.48 gramos para el medio de proliferación (MP), compuesto de medio básico MS (1962), disminuyendo los nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa suplementado con tiamina 40 mg.L^{-1} , 2,4-D 3.0 mg.L^{-1} , BA 1.0 mg.L^{-1} , ABA 4.23 mg.L^{-1} , PEG 7.5 gr.L^{-1} y caseína hidrolizada 100 mg.L^{-1} ; a los 50 días de haber iniciado su incubación, lo que nos permite inferir que los componentes de SE promueven un mayor incremento en masa, por lo que el medio suspensión embriogénica, donde fueron disminuidas las fuentes de amonio al 25% y las fuentes de nitratos al 75%, influyeron de manera determinante a la iniciación de masas de embriones cigóticos inmaduros, lo cual nos permitirá contar con mayor material para seguir promoviendo la diferenciación de embriones somáticos a partir del subcultivo de callos embriogénicos (Figura 12).

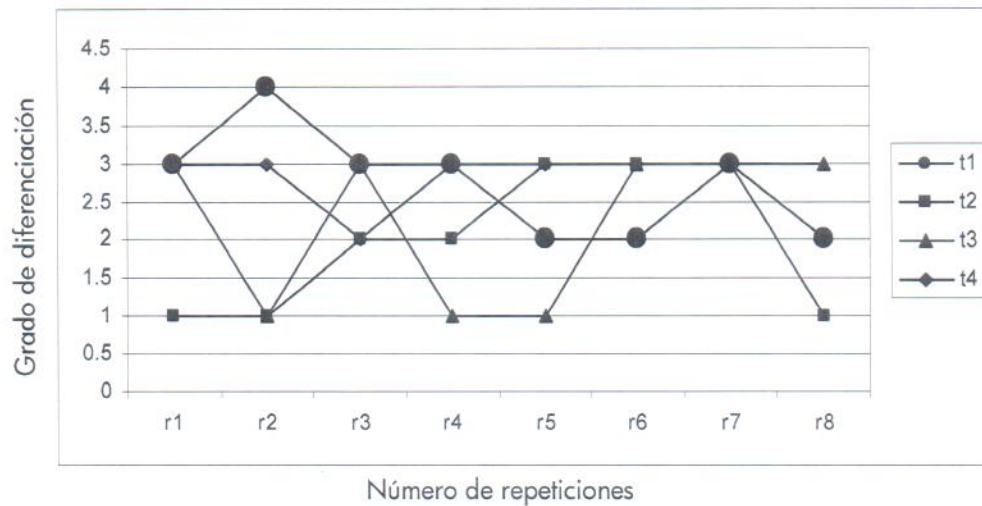


Figura 11. Resultados sobre la inducción de la embriogénesis somática a partir de callos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, obtenidos en un medio con las sales MS, en tratamiento medio de proliferación (MP) compuesto de medio básico MS (1962), disminuyendo los nitratos a un 50%, aumentando la fuente de fosfatos al 200% con 7% de agar y 3% de sacarosa suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ y su variación adicionando 1 gramo por litro de carbón activado así como y el tratamiento suspensión embriogénica (SE) con las fuentes de amonio disminuidas al 25%, fuentes de nitratos al 75%, con 3% de sacarosa, 7% de agar, suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ y su variación adicionando 1 gramo por litro de carbón activado después de 50 días de incubación con luz

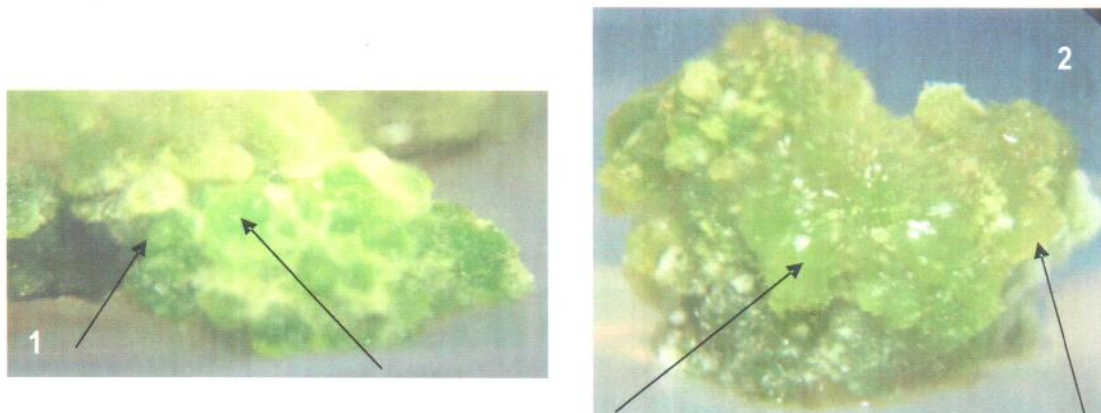


Figura 12. Callos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, en un medio con las sales MS, de proliferación (MP) 1, con nitratos al 50%, y fosfatos al 200%, 7% de agar y 3% de sacarosa, tiamina 40 mg.L⁻¹, 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ y medio de suspensión embriogénica (SE) 2 con amonio al 25%, nitratos al 75%, 3% de sacarosa, 7% de agar, tiamina 40 mg.L⁻¹, ácido 2,4-D 3.0 mg.L⁻¹, BA 1.0 mg.L⁻¹, ABA 4.23 mg.L⁻¹, PEG 7.5 gr.L⁻¹ y caseína hidrolizada 100 mg.L⁻¹ después de 50 días con luz .

5.3 Respuestas obtenidas de la diferenciación embriogénica

El efecto de la combinación caseína hidrolizada 500 mg.L⁻¹ y galactosa al 6% después de 60 días en los medios de diferenciación embriogénica promovió procesos de maduración preembrionaria del material obtenido de la fase experimental de suspensión y proliferación embriogénica, como se observa en la figura 13, donde se aprecian dichas estructuras, sin embargo las dosis empleadas en esta combinación (caseína hidrolizada 500 mg.L⁻¹ y galactosa al 6%) no fueron suficientes para que los callos alcanzaran la capacidad de almacenamiento de sustancias de reserva necesarias para evitar la desecación del material en proceso de diferenciación embriogénica. (Fernández *et al.*, 1994)

Como señalan Ramírez y Salazar 1998, los resultados del ensayo de diferenciación embriogénica, estuvieron marcados por la combinación de los reguladores de crecimiento tiamina, 2,4-D, BA, ABA, así como los coadyuvantes polietilén glicol y caseína hidrolizada en los cinco ensayos, así como las concentraciones de carbohidratos del 3 al 6% a través de la galactosa, influyendo en la formación de tejido embriogénico, después de 60 días en incubación se empezaron a manifestar estructuras proembrionarias, de aspecto blanco cremoso (Figura 13).

Se realizaron subcultivos, cambiando el material a frascos con medio de cultivo con y sin carbón activado con medio básico MS (1962) y vitaminas WS al 100% bajo los tratamientos, ya que el material en esta fase comenzó a deshidratarse y a necrosarse, manifestándose los mismos síntomas de estrés en los cinco tratamientos, optándose por utilizar medio sin carbón activado para que los nutrientes estuvieran disponibles al 100% para los callos.

Los resultados del análisis de varianza, ($P \leq 0.001$), nos permiten concluir que existen diferencias entre tratamientos. Se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

para determinar el tratamiento que tuvo mejor efecto en la formación de estructuras proembriones (Cuadro 3). El tratamiento DE2 tuvo menores niveles de necrosamiento y el tratamiento DE4 un nivel más alto de estructuras proembrionarias.

Cuadro3. Resultados de los tratamientos de diferenciación embriogénica por la prueba de Tukey

Tratamiento	Grupo	Media
DE1	a	3.33
DE2	b*	2.33
DE3	a	2.83
DE4	c*	2.03
DE5	a	3.15

Tratamientos con la misma letra no son estadística diferentes, según Tukey ($P \leq 0.05$)

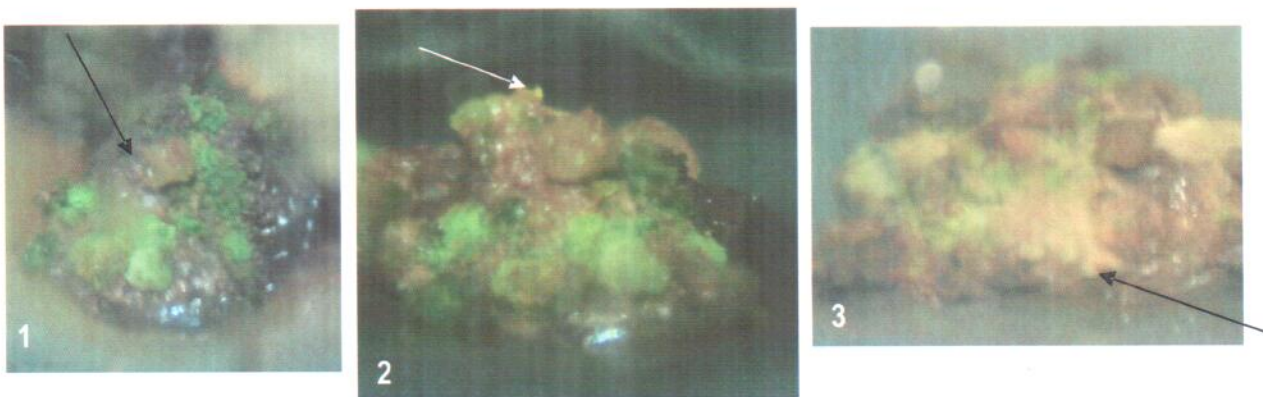


Figura 13. Embriones de *Pseudotsuga macrolepis* Flous a partir de callos, estructuras , obtenidos en un medio MS (1962) al 100%, vitaminas WS al 100%, **DE1** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, ácido 2,4-D 3 mg.L⁻¹ y BA 1 mg.L⁻¹. **DE2** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 3%, ácido 2,4-D 1 mg.L⁻¹ y BA 0.3 mg.L⁻¹. **DE3** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, sin reguladores de crecimiento. **DE4** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, ácido 2,4-D 0.5 mg.L⁻¹, BA 0.1 mg.L⁻¹ y 0.1 mg.L⁻¹ de kinetina y el **DE5** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, BA 0.5 mg.L⁻¹ y 0.5 mg.L⁻¹ de kinetina después de 60 días con luz. Imagen 1 callo en tratamiento **DE2**, imagen 2 en tratamiento **DE4** e imagen 3 tratamiento **DE4**

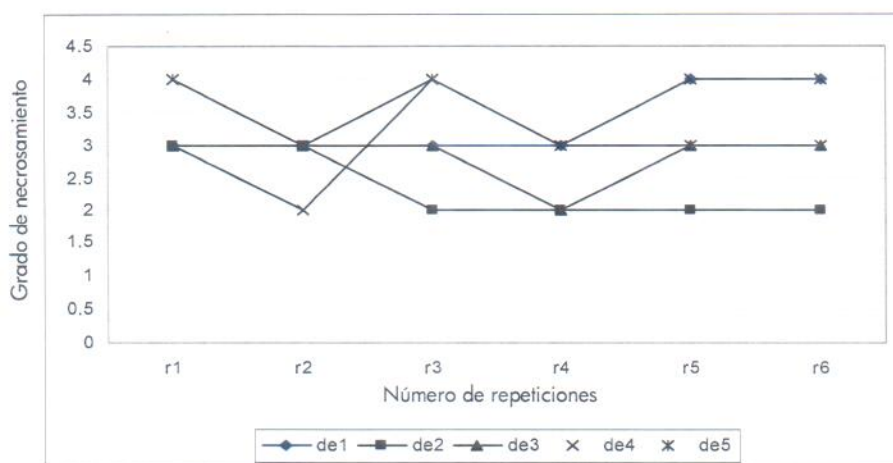


Figura 14. Niveles de necrosamiento obtenidos en callos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous después de 50 días de incubación bajo los tratamientos sin carbón activado con medio básico MS (1962) y vitaminas WS al 100% bajo las variaciones: **DE1** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, 2,4-D 3 mg.L⁻¹ y BA 1 mg.L⁻¹. **DE2** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 3%, 2,4-D 1 mg.L⁻¹ y BA 0.3 mg.L⁻¹. **DE3** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, sin reguladores de crecimiento. **DE4** con L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, 2,4-D 0.5 mg.L⁻¹, BA 0.1 mg.L⁻¹ y 0.1 mg.L⁻¹ de kinetina y el **DE5** compuesto por L-glutamina 450 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, galactosa 6%, BA 0.5 mg.L⁻¹ y 0.5 mg.L⁻¹ de kinetina, del desarrollo embrionario.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Para la primera fase o fase de iniciación de callos embriogénicos, se recomienda cultivar de embriones cigóticos maduros completos en medio MS 1962 con disminución de nitratos a un 50%, aumentando fosfatos al 200%, reguladores de crecimiento descritos para tal fin, aumentando la sacarosa al 6%, con la finalidad de generar callos con suficiente reserva de nutrientes para continuar la segunda fase de maduración.

Respecto a la fase de germinación de embriones continuar con el empleo de los tratamientos sugeridos en esta investigación medio de proliferación (MP) y suspensión embriogénica (SE) probando dosis más altas de PEG y ABA para acelerar la diferenciación y maduración de los embriones que se encuentren en estado inicial o globular así como estabilizar los procesos embriogénicos.

Continuar incluyendo el empleo de caseína hidrolizada para tener callos embriogénicos con suficiente material de reserva y resistencia a la desecación. Se sugiere probar estos tratamientos sin reguladores de crecimiento y realizar subcultivos cada 20 días.

En la fase de inducción de la embriogénesis somática, se sugiere ensayar en medios líquidos con inmersión transitoria (causar estrés por la ausencia de nutrientes) por una semana y subcultivar a medios sólidos para ejercer un efecto regulador en el desarrollo de los embriones somáticos.

Probar temperaturas bajas hasta 4°C para generar un shock térmico que induzca a las masas celulares a acumular nutrientes y favorecer la maduración de embriones.

Establecer pruebas de los tratamientos recomendados en esta investigación para inducir, proliferar y madurar embriones somáticos a partir de embriones cigóticos

inmaduros de *Pseudotsuga mucrolepis* Flous de acuerdo a estudios realizados para inducir la embriogénesis somática en el género *Pinus* donde se han regenerado plantas hasta el 95% iniciando con embriones cigóticos inmaduros hasta un 55% de embriones cigóticos maduros (Tautorus *et al.*, 1991).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, en la fase de iniciación de la embriogénesis somática, emplear el tratamiento donde la fuente de fosfato se aumentó al 200% y los nitratos se disminuyeron al 50% para obtener masas celulares de mayor volumen para continuar la fase de proliferación

Para lograr la maduración de embriones somáticos, continuar con el empleo de fuentes de carbohidratos con galactosa y con los coadyuvantes caseína hidrolizada y polietilenglicol, realizar subcultivos cada 15 días para eliminar los exudados de compuestos fenólicos emitidos por los callos en la fase de maduración enjuagando el material en agua esterilizada con antioxidantes.

Probar inhibidores de la oxidación en los medios de cultivo que no sea a base de carbón activado ya que por práctica adquirida en esta experimentación, este inhibidor adsorbió los nutrientes, imposibilitando la nutrición de las masas de callos durante procesos de división celular.

VII. ANEXOS

Cuadro 4. Medio Básico de Murashige y Skoog (MS, 1962)

Formula sales inorgánicas	
Nombre del compuesto	Concentración original mg/L
Nitratos:	
NKO_3	1900
NH_4NO_3	1650
Sulfatos:	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Halógenos:	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KI	0.83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fosfatos:	
PO_4 ; BO_3 ; MoO_4	
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Solución de Fierro:	
NaFe-EDTA	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	41.23
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8

Cuadro 5. Vitaminas WS (Aguilar, 1997)

Compuestos	Cantidad 100 mL de solución madre
Tiamina	10 mg
Pantenol de calcio	10 mg
Myo-inositol	100 mg
Piridoxina HCL	10 mg
Ácido nicotínico	50 mg
Rivoflavina	5 mg
Ácido Fólico	1 mg
Biotina	0.1 mg
Ácido para-aminobenzoico	5 mg

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO R., R. 1998. Estudio sinecológico del bosque de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. oaxacana Debreczy & Racz, en la zona de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. Tesis. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. 105 pp.

AITKEN C. J. y M. Connett. 1992. Micropropagation of Forest Trees in Transplant Production System Kurata. Kluwer Academic Publisher the Netherlands. Pp.: 163-194.

CELESTINO, C. Hernández I., Carneros E., López-Vela D. y Toribio M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMDRA). Finca El Encía Apdo. 127. 28800 Madrid. Julio, 2005. 13 pp.

CIBRIAN T. D., J. T. Méndez M, R. Campos B., H. O. Yates I., J. Flores L. 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 453 p.

CIBRIAN T. D., D. Alvarado R., S. García D. 2007. Enfermedades Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 587 p.

CONTREAS M., R. Luna V., I. y Morrone J., J. Elementos No. 41, Vol. 8, Marzo-Mayo, 2001. Página 33. UNAM

DEBRECZY, Z., and RACZ, I. 1995. New species and varieties of conifers from Mexico. Phytologia 78: 217-243.

DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. 2002. Segunda sección-SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio lista de especies en riesgo. Marzo de 2002. 85 pp.

DOMÍNGEZ A., F.A. 1986. Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, en la región de Huayacocotla, Ver. Tesis. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. 266 pp.

FARJON, A. 1990. Pinaceae: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books. Königstein. pp. 177-191.

FAO. Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2005, Hacia la ordenación forestal sostenible Capítulo 2: Extensión de los recursos forestales. p.16

FERNÁNDEZ, G.B., C. Celestino y M. Toribio., 1994. Somatic embriogénesis in *Quercus suber* L. Biotechnology of Trees. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Serie No. 4. INIA. Madrid, España. pp. 105-110.

FOWELLS, H.A. 1965. Silvics of forest trees of the United Status. USDA, Forest Service Agriculture Handbook No. 271, pp. 546-556.

HERMANN, R. K. y D. P. Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. In: Burns R.y B. H. Honkala (coord. téc.). Silvics of North America. Vol. 1, Conifers. USDA Forest Service. Washington, D.C. pp. 527-540.

MARTINEZ, M. 1963. Las Pináceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México, 3ra edición. México, D.F. pp.27-74.

MERKLE, S.A. y J. F. Dean. 2000. Forest tree biotechnology. Current Option Biotech. 11. pp.289-302.

RAMIREZ V. C., y Y. E. Salazar. 1998. Cultivo in vitro de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, Zulia, Venezuela. pp. 7 y 8

RZEDOWSKI R., J., L. Vela G. y X. Madrigal S. 1977. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los bosques de coníferas en México. Ciencias Forestales 1(2). pp.15-35.

SEMARNAT. Compendio de Estadísticas Ambientales, 2002. México, D. F., 2003. Velásquez, A., J.F. Mas, J.R. Díaz-Gallegos, R. Mayorga-Saucedo, P.C. Alcántara, R. Castro, T. Fernández, G. Bocco, E. Ezcurra y J.L. Palacio. 2002. Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. Gaceta 62. Instituto Nacional de Ecología.

TISSERAT, B., ESAN, E.B. y MURASHIGE, T. 1979. Somatic Embriogenesis in angiosperms. Horticultura Reviws. 47 pp.

TAUTORUS T. A., L. Fowke C. y D. Dunstan I. 1991. Somatic embriogénesis in conifers. Can. J. Bot. 69: 1873-1899.

ZAVALA Ch. F., J.T. Méndez M. 1996. Factores que afectan la producción de semilla en *Pseudotsuga macrolepis* Flous en el Estado de Hidalgo, México. Acta Botánica. 36:1-13.