

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE
Pseudotsuga macrolepis Flous. *In Vitro*

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:

MARIA GUADALUPE CARRILLO BENITEZ

Chapingo, Estado de México, Agosto del 2005



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

BIBLIOTECA DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

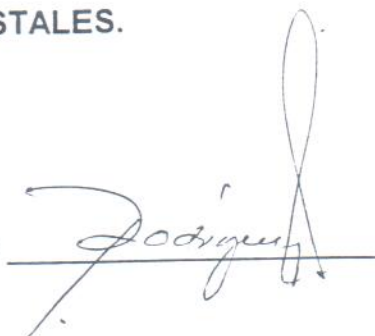


RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE *Pseudotsuga macrolepis* Flous. In Vitro

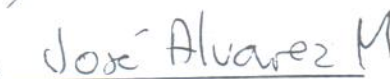
Tesis realizada por **MARÍA GUADALUPE CARRILLO BENITEZ** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS FORESTALES.

DIRECTOR: DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O



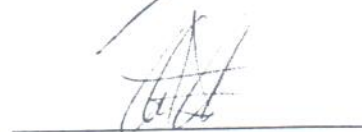
ASESOR: M.C. JOSÉ GPE. ÁLVAREZ MOCTEZUMA



ASESOR: DR. DAVID CIBRIÁN TOVAR



ASESOR: M.C. ALEJANDRO CORONA AMBRIZ



DATOS BIOGRÁFICOS

La autora nació el día 25 de junio de 1976 en el estado de Oaxaca. Su instrucción pre-escolar y educación primaria de primero a cuarto año, la realizó en el "Colegio Guadalupe" ubicado en Ocotlán de Morelos, Oax., durante el periodo de 1978 a 1982 y de 1982 a 1986, el quinto y sexto año, los realizó en el "Colegio Fray Pedro De Gante", durante el periodo 1986 a 1988. Posteriormente, su educación secundaria la recibió en la Escuela secundaria federal "Mariano Matamoros" de Calpulalpan, Tlaxcala., durante el periodo 1989 a 1991, su formación media superior la recibió en el Centro de Bachillerato Tecnológico industrial y de servicios No. 154, en el periodo de 1991 a 1994, de Calp.,Tlax., formó parte de la Orquesta Sinfónica Infantil y Juvenil del IMSS Tlaxcala en el periodo de 1991 a 1994.

Ingreso a la "Universidad Autónoma Chapingo", en 1996 y culminó su formación profesional en la carrera de Ingeniero Agrónomo en el departamento de Parasitología Agrícola en el año 2001. Participó en el proyecto de producción de parasitoides para el control de la plaga del Eucalipto, dirigido por el Dr. David Cibrián T.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las instituciones y personas que colaboraron en el logro de este objetivo:

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme otra oportunidad de superación académica.

Al Dr. José Luis Rodríguez De La O quien apoyó incondicionalmente la realización de este trabajo, por su aporte de experiencia invaluable y por ser una gran persona.

Al DR. David Cibrián Tovar por formar parte del comité asesor, por su apoyo y comprensión al haberme permitido cambiar el enfoque de estudio de la tesis.

Al M.C. José Guadalupe Álvarez Moctezuma por formar parte del comité asesor y su apoyo para concluir este trabajo.

AL M.C. Alejandro Corona Ambriz por formar parte del comité asesor y asesoría en la parte estadística de este trabajo.

A la Dra. Amparo Borja De La Rosa Coordinadora del la Maestría de Ciencias Forestales, por todas las atenciones prestadas en el transcurso de mis estudios.

A la M.C. Aída Carrillo Ocampo, por su apoyo incondicional y asesoría en la descripción de la semilla.

A la Ing. Norma Aguilar por su amistad, apoyo y asesoría en el laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Fitotecnia.

Al Colegio de Postgraduados por proporcionar las plantas, utilizadas en este trabajo.

A la Lic. Gisela García por las sugerencias en el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Fitotecnia.

A todos mis compañeros y grandes amigos que me brindaron una amistad incondicional: Ma. Guadalupe (Lupy), Rogelio, Susy, Ana y su Bebé, Yolis, Andrés, Miguel Ángel, Alejandro, Cesar, Nelly, Toño, Faby, José Porfirio, Marco, Katy, Lupita, Martha, Sra. Ángeles, Alegracias por todo.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por haberme dejado concluir otra fase más en mi vida.

A MIS PADRES:

Amadeo y Lupita

Mis dos más grandes amigos, a quienes amo por su apoyo e impulso para seguir adelante.

A MIS HERMANAS:

Lolita y Paty, que siempre están a mi lado....

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

Por haber compartido un momento de su vida y por los buenos recuerdos, gracias.

ÍNDICE

Página

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiii
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 General.....	3
2.2. Específicos:.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Importancia de los recursos forestales en el mundo.....	4
3.2. Importancia de los recursos forestales en México.	5
3.3. Importancia del género <i>Pseudotsuga</i>	7
3.3.1. Distribución mundial y nacional	8
3.3.2 Características de clasificación taxonómica de <i>Pseudotsuga</i>	9
3.3.3. Descripción del género <i>Pseudotsuga</i> Carr.....	10
3.3.4. Descripción de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> Flous.....	11
3.3.5. Descripción general de la madera.....	12
3.3.6. Semilla.....	13
3.3.7. Anatomía de la semilla.....	13
3.3.8. Hábitat.....	14
3.3.9. Clima:.....	14
3.3.10. Suelo.....	15
3.4. Actividades de conservación <i>in situ</i>	17
3.5. Actividades de Conservación <i>ex situ</i>	17
3.6. Plantaciones de conservación	18
3.7. Problemática de propagación y mejoramiento de <i>Pseudotsuga</i>	19
3.8. Aplicaciones de la Biotecnología en los Recursos Forestales.....	20
3.8.1. Estudios de Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos de Coníferas.....	21
3.8.1.1. Cultivo de células en suspensión.....	21
3.8.1.2. Marcadores genéticos.....	23
3.8.1.3. Transformación genética.....	24
3.8.1.4. Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de Coníferas.....	24
3.8.1.5. Embriogénesis somática.....	25
3.8.1.6. Organogénesis.....	32

3.9. Medio de cultivo.....	33
3.9.1. Reguladores de crecimiento.....	35
3.9.1.1. Auxinas.....	35
3.9.1.2. Citocininas.....	36
3.9.2. Las auxinas y citocininas en el medio de cultivo.....	36
3.10. Incubación o Cuarto de crecimiento.....	37
3.10.1. Luz.....	37
3.10.2. Temperatura.....	38
3.11. Importancia de las micorrizas.....	39
3.11.1. Asociación entre ecto y endomicorrizas.....	41
3.11.2. Uso de las micorrizas.....	41
4. MATERIALES Y METODOS.....	42
4.1. Ubicación del sitio experimental.....	42
4.2. Procedencia del material vegetal.....	42
4.3. Pruebas de desinfestación	42
4.4. Pruebas de germinación.....	43
4.4.1. Prueba en cámaras de germinación.....	43
4.4.2. Prueba en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).....	44
4.5. Medio de cultivo.....	44
4.5.1. Medio para germinación <i>in vitro</i> de semillas y embriones.....	44
4.5.2. Medio para inducir la formación de callo.....	44
4.5.3. Medio para proliferación de callos.....	45
4.5.4. Medio para inducir el crecimiento de callos.....	45
4.5.5. Medio para la formación de embriones.....	46
4.5.6. Medio para inducir la Organogénesis.....	46
4.5.7. Medio para desarrollo de plántulas.....	46
4.6. Cultivo.....	47
4.7. Incubación.....	48
4.8. Aclimatación de las plántulas fuera del medio de cultivo.....	49
4.9. Evaluación de las pruebas de desinfestación y germinación.....	50
4.10. Evaluación de la formación y crecimiento de callos.....	50
4.11. Evaluación de yemas, ápices y tallos.....	51
4.12. Evaluación de los callos en medio HS (1972) con BA y KIN.....	51
4.12.1. Modelo estadístico.	52
4.13. Evaluación de la recuperación de callos en medio HS (1972) con BA y KIN.....	52
4.13.1. Modelo estadístico.....	53
4.14. Evaluación de la formación de embriones en medio HS (1972) con ABA.....	53
4.15. Evaluación del crecimiento de callos en medio HS (1972) con	

ABA.....	54
4.16. Evaluación del desarrollo y aclimatación de las plántulas dentro y fuera del medio MS (1962).....	55
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	56
5.1. Descripción de la semilla.....	56
5.2. Respuesta a la prueba de desinfestación y germinación.....	56
5.3. Respuesta de la germinación con embriones en medio MS (1962).....	57
5.4. Respuesta al medio para inducir la formación de callos.....	58
5.5. Respuesta al medio de proliferación de callos.....	59
5.6. Respuesta de las yemas, ápices y tallos.....	62
5.7. Respuesta de los callos al medio HS (1972) con BA y KIN.....	63
5.8. Respuesta a la recuperación por necrosamiento en medio HS (1972) con BA y KIN.....	63
5.9 Respuesta de la formación de embriones en medio HS (1972) con ABA..	64
5.10. Respuesta de los callos en medio HS (1972) con ABA.....	65
5.11. Respuesta al medio MS (1962) en la formación de plántulas.....	67
5.11.1. Respuesta al medio MS (1962) adicionado con azúcar.....	67
5.11.2. Respuesta al medio adicionado con sacarosa.....	69
5.11.3. Discusión del desarrollo de las plántulas en medio MS (1962) con azúcar y sacarosa.....	73
5.12. Respuesta de la aclimatación de las plántulas fuera del medio.....	74
6. CONCLUSIONES	76
7. RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de la producción forestal en México	..	6
Cuadro 2. Climas donde prospera <i>Pseudotsuga</i> en México	..	16
Cuadro 3. Especies nativas con prioridad en la región Norte de Méx.	..	18
Cuadro 4. Tratamientos	..	51
Cuadro 5. Tratamientos	..	54
Cuadro 6. Porcentaje de germinación de los embriones	..	58
Cuadro 7. Agrupación de los tratamientos por TUKEY	..	64
Cuadro 8. Número de hojas por plántula de <i>Pseudotsuga</i> (azúcar al 6 %)	..	67
Cuadro 9. Número de hojas por plántula de <i>Pseudotsuga</i> (azúcar al 3 %)	..	68
Cuadro 10. Altura de las plántulas de <i>Pseudotsuga</i> (azúcar al 3%)	..	69
Cuadro 11. Número de hojas por plántula de <i>Pseudotsuga</i> (sacarosa al 6 %)	..	70
Cuadro 12. Altura de las plántulas de <i>Pseudotsuga</i> (sacarosa al 6 %)	..	70
Cuadro 13. Número de hojas por plántula de <i>Pseudotsuga</i> (sacarosa al 3 %)	..	71
Cuadro 14. Altura de las plántulas de <i>Pseudotsuga</i> (sacarosa al 3 %)	..	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países megadiversos	4
Figura 2. Distribución de la vegetación en México	5
Figura 3. Distribución del género <i>Pseudotsuga</i> en México	9
Figura 4. Gráfica de germinación de embriones de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> F.	58
Figura 5. Semilla y embrión de <i>P. macrolepis</i> F.	61
Figura 6. Semilla, embriones y formación de callos en medio MS (1962).	61
Figura 7. Gráfica del porcentaje de necrosamiento de explantes (ápices, yemas y tallos) de <i>Pseudotsuga</i> .	62
Figura 8. Promedio del diámetro de callos de <i>P. macrolepis</i> F. en medio HS (1972) con ABA.	65
Figura 9. a) Necrosamiento de ápices de <i>P. macrolepis</i> F. en medio MS (1962), b) y d) Callos en medio HS (1972) con BA y KIN, c) Formación de estructuras embriogénicas en medio HS (1972) con ABA.	66
Figura 10. Número de hojas por plántula de <i>P. macrolepis</i> F. (azúcar al 6%)	67
Figura 11. Número de hojas por plántula de <i>P. macrolepis</i> F. (azúcar al 3%)	68
Figura 12. Altura de las plántulas de <i>P. macrolepis</i> F. (azúcar al 3%)	69
Figura 13. Número de hojas por plántula de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> F. (sacarosa al 6 %)	70
Figura 14. Altura de las plántulas de <i>P. macrolepis</i> F. (sacarosa al 6 %)	71
Figura 15. Número de hojas por plántula de <i>P. macrolepis</i> F. (sacarosa al 3 %)	72
Figura 16. Altura de las plántulas de <i>P. macrolepis</i> F. (sacarosa al 3 %)	72
Figura 17. Plántulas de <i>P. macrolepis</i> F. en medio MS (1962) con azúcar y sacarosa al 3 y 6 %	74
Figura 18. Aclimatación de las plántulas fuera del medio de cultivo	75

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE *Pseudotsuga macrolepis* Flous. *In Vitro*

MORPHOGENIC RESPONSES OF *Pseudotsuga macrolepis* Flous *In Vitro*

Maria Guadalupe Carrillo Benitez¹, José Luis Rodríguez De La O².

RESUMEN

Se evaluaron las respuestas morfogénicas a partir de embriones cigóticos cultivados *in vitro* de semillas de un año de almacenamiento de *Pseudotsuga macrolepis* F., colectada en Tlaxco, Tlaxcala. Las semillas fueron desinfectadas con detergente y agua oxigenada (H₂O₂), durante 48 horas en agitación a 50 RPM, cultivados en medio MS (1962) sin reguladores, la germinación ocurrió después de 7 días y posteriormente subcultivados a un medio MS con 2,4-D (3.0 mg·L⁻¹) y BA (1.0 mg·L⁻¹). Con los callos obtenidos en un medio HS (1972), se evaluaron 3 concentraciones de ABA para promover la formación de estructuras embrionarias, presentándose el mejor tratamiento con una concentración de 10.0 mg·L⁻¹ (Pr>F=<.0001). En el crecimiento, el mejor desarrollo de plántulas se presentó empleando un medio MS (1962) con sacarosa al 6%, sin embargo fue necesario utilizar un sustrato con micorrizas para la mejor adaptación de las plántulas a suelo.

Palabras-clave: *Pseudotsuga*, Embriones, Callos, Plántulas, Reguladores de crecimiento.

SUMMARY

Morphogenic responses from the cigotic embryos cultivated *in vitro* and that came from *Pseudotsuga macrolepis* F. seeds that had been stored for a year for research and originally were collected in Tlaxco, Tlaxcala were evaluated. The seeds were disinfected with detergent and hydrogen peroxide (H₂O₂) for 48 hours by shaking at 50 RPM and cultivated in MS (1962) medium without regulators. Germination occurred after 7 days and later on the embryos were subcultivated in MS (1962) medium with 2,4-D (3.0 mg·L⁻¹) and BA (1.0 mg·L⁻¹). With the calluses obtained in an HS (1972) medium, 3 concentrations of ABA were evaluated to promote embryonal structure formation. The best treatment occurred with a concentration of 10.0 mg·L⁻¹ (Pr>F=<.0001). During growth, more plant development occurred in an MS (1962) medium with 6 % sucrose. However, it was necessary to use a substratum with mycorrhizae for the best adaptation of seedlings to soil.

Key words: *Pseudotsuga*, Embryos, Calluses, Plants, Growth regulators.

¹ Tesista

² Director

¹ Thesis author

² Thesis director

1. INTRODUCCIÓN

El género *Pseudotsuga* pertenece a la Familia Pinaceae, conífera originaria del occidente de Norteamérica, extendiéndose hasta Asia (Strauss y Doerksen, 1990), estudios con marcadores moleculares mencionan que por su evolución a través del tiempo, ocasionaron un impacto en su estructura genética, causando una diferenciación geográfica, aumentando la deriva genética y diversidad entre poblaciones (Li y Adams, 1989). En México este género lo encontramos en el Noreste, Centro y Sur, sus poblaciones son reducidas y aisladas (Domínguez, 1994). Mápula (1995), menciona que estas poblaciones se encuentran amenazadas debido a su baja regeneración natural y a la deforestación. Las especies de *Pseudotsuga* se encuentran en la categoría de amenazadas y en peligro de extinción, dentro de la Norma Oficial NOM-59-ECOL-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994). En Canadá y Estados Unidos *P. menziesii* tiene importancia económica, ahí se cultiva para producción de madera y árboles de navidad; esta especie se ha introducido para plantaciones comerciales en varios Países (Owstton y Stein, 1974). La importancia de este género radica en el aspecto ambiental (captura de carbono), económico (producción de árboles de navidad y plantaciones especializadas), social (generación de empleos en las áreas rurales), ecológica y forestal (especie en peligro de extinción y distribución fitogeográfica) (SEMARNAT, 2001). En México las poblaciones de este *Pseudotsuga* se ven amenazadas por el calentamiento global, y alteradas por factores antropogénicos, como incendios, cambio de suelo, corta de árboles, plagas y enfermedades que reducen la producción de conos y semillas (Guerra, 2001), el tamaño pequeño y distribución limitada de sus poblaciones

reduce la variabilidad entre ellos, aumentando la endogamia y disminuyendo la capacidad reproductiva de las especies (Mosseler *et al.*, 2000; Saccheri *et al.*, 1998). Al estar en los márgenes de la distribución las poblaciones están más limitadas para producir germoplasma.

Con las pérdidas graduales o destrucciones completas, se pierden elementos genéticos importantes, lo que lleva a la búsqueda de estrategias que preserven el potencial evolutivo de la especie y el establecimiento de plantaciones, donde se desarrollen métodos apropiados, que incluyan las mejores técnicas de germinación y cultivo.

El cultivo de tejidos ofrece un gran potencial como apoyo a los métodos tradicionales, al incrementar la producción de variedades genéticamente superiores, provenientes de la selección de poblaciones naturales, de mejoramiento convencional o producir a partir de un número limitado de semillas, esto permite crear bancos de Germoplasma, de especies en peligro de extinción, para la conservación de la biodiversidad, protección de los suelos y de la fauna silvestre que se desarrolla en sus áreas de distribución.

Por lo anterior, la finalidad del presente trabajo es coadyuvar, por medio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, en la multiplicación y en la conservación de las especies amenazadas o en peligro de extinción.

2. OBJETIVOS.

2.1 General:

Evaluar las condiciones *in vitro* que permitan promover y evaluar las respuestas morfogénicas a partir del cultivo de embriones.

2.2. Específicos:

- Encontrar el mejor método de desinfestación de explantes.
- Promover la germinación *in vitro* a partir de semillas y embriones.
- Promover la morfogénesis *in vitro* con reguladores de crecimiento a partir de embriones.
- Inducir la embriogénesis y la organogénesis a partir de ápices, hojas y tallos.
- Obtener plántulas *in vitro* y su aclimatación fuera del medio de cultivo.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia de los recursos forestales en el mundo.

Los esfuerzos de las diversas sociedades mundiales por cuidar y manejar los recursos naturales, han llevado a la creación de áreas naturales protegidas (ANP); las cuales representan uno de los pilares más importantes para la conservación de la naturaleza en todo el mundo. Sin embargo, esto no resuelve todos los problemas, debido a que las condiciones económicas o sociales; a nivel local o regional muchas veces impiden la eficacia y funcionalidad de estas áreas.

El incremento de la demanda de productos forestales y el crecimiento de la mancha urbana, contribuyen en forma rápida a la disminución de las áreas forestales del mundo, problema que se ve más acentuado en los países en desarrollo. En 1995 se contaba con una superficie forestal mundial de 3, 454 millones de Has, de las cuales más de la mitad corresponden a países en desarrollo, y para nuestros días las pérdidas han sido devastadoras; sin embargo existen, 12 países a nivel mundial que aun conservan parte de su riqueza biológica y son conocidos como países megadiversos (SEMARNAT, 2000).

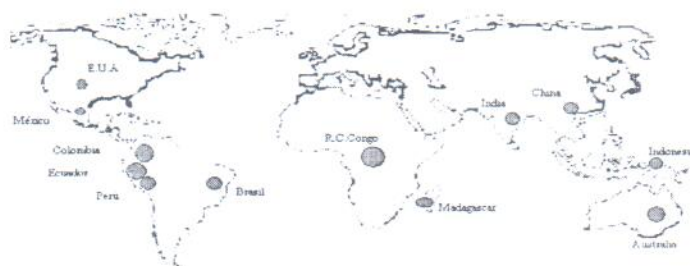


Figura 1. Países megadiversos (SEMARNAT, 2000).

3.2. Importancia de los recursos forestales en México

México es un país reconocido mundialmente por pertenecer al grupo de los 12 países megadiversos, ocupando el 4º lugar, por tener entre el 60 y 70 % de la diversidad biológica total mundial (ver figura 1). Con especies que sólo existen en México, como los cactus y agaves del desierto, musgos y líquenes de montañas elevadas y la gran diversidad biológica que se encuentra en la selva tropical. (SEMARNAT/CONAFOR, 2001) (Ver figura 2). Sin embargo, debido a las actividades agrícolas y forestales que se dan por la fertilidad de sus suelos, el clima con estaciones marcadas y la buena calidad maderable de sus bosques, aunado con el crecimiento de la mancha urbana los diferentes ecosistemas están siendo afectados, repercutiendo en su degradación.

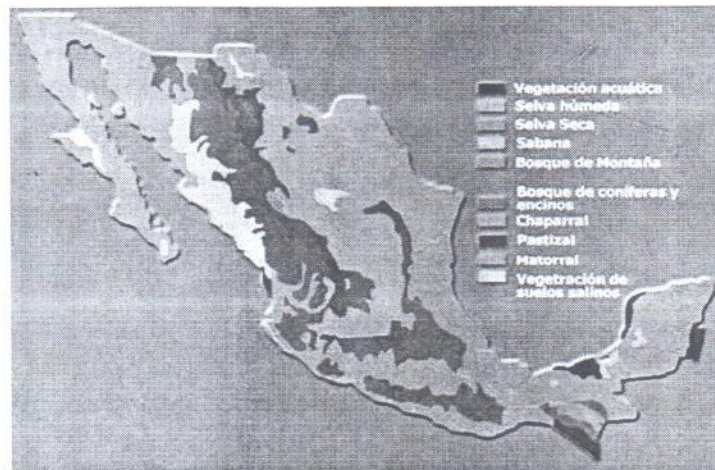


Figura 2 Distribución de la vegetación en México (SEMARNAT/CONAFOR, 2001)

Por otro lado, la superficie forestal conocida en México es de 56.8 millones de Has (Varela, 1998), divididas en bosques para la producción maderable y bosques de conservación y protección (ver cuadro1).

En total los ecosistemas forestales junto con las áreas de producción de la región templado-fría, representa una superficie aproximada de 30.5 millones de has., por lo que los bosques de coníferas y latifoliadas de clima templado representan el mayor potencial de producción maderable, en especial en la región norte del país (Vargas, 2003).

Cuadro 1. Distribución de la producción forestal en México, (Varela, 1998)

Distribución	Superficie en Millones de Hectáreas
Terrenos para la producción maderable	21.61
Divididos en:	
Bosques de coníferas y latifoliadas de clima templado- frío	10.8
Bosques tropicales y subtropicales	6.8
Bosques de latifoliadas de clima templado	4
Bosques de protección y conservación	35.19

Una de las razones por la cual, los bosques templados, los bosques tropicales y subtropicales están siendo amenazados, es por el cambio de uso del suelo; En la última década (1990-1999) los incendios afectaron anualmente a más de 600 000 has de terrenos forestales (Figuroa, 1998). Dando como resultado una grave erosión genética en los ecosistemas, perdiéndose así los recursos genéticos forestales valiosos en las poblaciones marginales. Por lo que es urgente buscar y definir estrategias que permitan planificar las acciones de conservación y uso sostenible.

3.3. Importancia del género *Pseudotsuga*

Pseudotsuga es uno de los géneros de la familia Pinaceae, cuyas poblaciones han estado sujetas a altas presiones en los últimos años, este género tiene importancia económica y se encuentra en una amplia distribución en las regiones templado-frías de la tierra. Su importancia recae en las plantaciones comerciales, con la captura de carbono, contribuyendo a la mitigación del cambio climático global y disminuyendo el efecto invernadero, las plantaciones también ayudan a la reincorporación de terrenos al uso forestal, otro objetivo de las plantaciones es la producción de árboles de Navidad por ser un producto de alto valor agregado y de rápida colocación en el mercado, siempre que se cumpla con las normas de calidad que se exijan. La producción de árboles de Navidad permite la generación de empleos en las áreas rurales, y así dar un uso sustentable y productivo al suelo, para evitar el avance de la mancha urbana sobre terrenos no arbolados (SEMARNAT/CONAFOR, 2001)

Debido a que la superficie cubierta por este género, es mínima en México y sus poblaciones se encuentran distribuidas en pequeños manchones en entidades del Norte, Centro y Sur del país, razón por la cual, hace que sea ecológica y botánicamente importante dentro de las mezclas de los bosques de coníferas, también tiene importancia fitogeográfica, sus poblaciones ayudan a explicar la evolución y distribución de las coníferas de México.

Sin embargo, estas últimas poblaciones se ven amenazadas por el calentamiento global y alteradas por factores antropogénicos, como incendios, cambio de suelo, corta de árboles, plagas y enfermedades que reducen la

producción de conos y semillas (Guerra, 2001), y su limitada distribución reduce la variabilidad entre ellos, aumentando la endogamia y disminuyendo la capacidad reproductiva de las especies (Saccheri *et al.*, 1998; Mosseler *et al.*, 2000). Al estar en los márgenes de la distribución, las poblaciones están más limitadas para producir germoplasma, y con las pérdidas graduales o destrucciones completas, se pierden elementos genéticos importantes, lo que lleva a la búsqueda de estrategias que preserven el potencial evolutivo de la especie y el establecimiento de plantaciones, donde se desarrollen métodos apropiados que incluyan las mejores técnicas de germinación y cultivo.

3.3.1. Distribución mundial y nacional

El género *Pseudotsuga* Carr., se distribuye en el hemisferio norte, a los lados del Océano Pacífico, en el Oeste de América del Norte y en el Sureste de Asia, su distribución es más amplia en América del Norte y conforme bajan hacia el sur del continente americano, las poblaciones se encuentran discontinuas, fragmentadas y mezcladas con otras especies arbóreas (Farjon, 1990).

El género *Pseudotsuga* en México, se localiza en sitios húmedos y protegidos; en un intervalo de 14° de latitud y en un rango de altitudinal de 1600 -3600 msnm, con una distribución discontinua y fragmentada, se encuentra entre las Sierras Madre Occidental y Oriental con algunas poblaciones en el eje Volcánico Transversal y en el Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca, donde se encuentran mezcladas con otras especies (Rzedowski, 2001; Domínguez 1994) (ver figura 3).

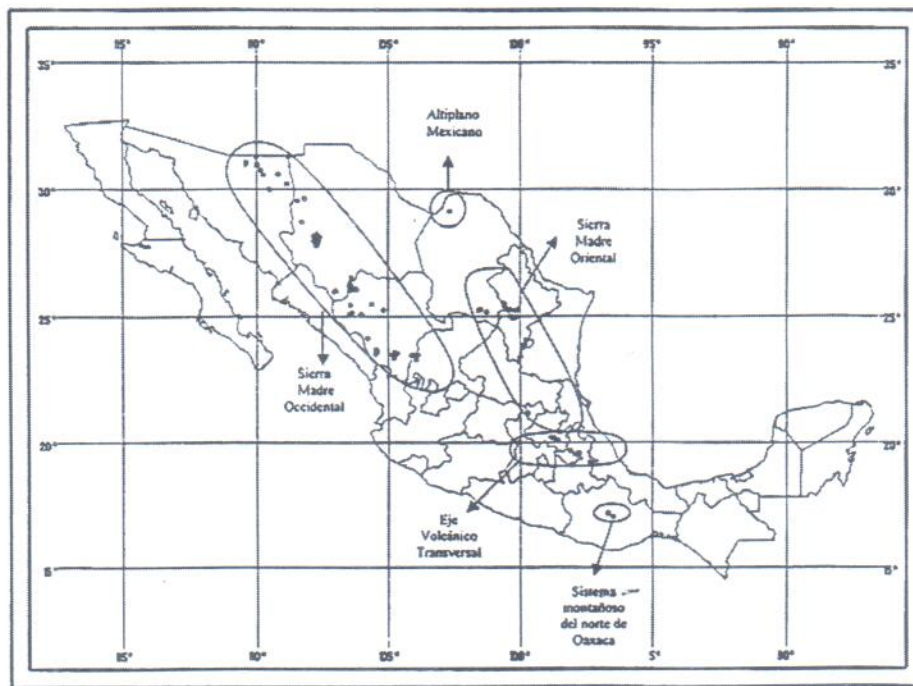


Figura 3. Distribución actual del género *Pseudotsuga* en México (Acevedo, 2004)

3.3.2. Características de clasificación taxonómica de *Pseudotsuga*

Morgenstern, citado por Acevedo (2004) menciona que las poblaciones de *Pseudotsuga* se ven afectadas, por los factores ambientales, que influyen en la selección natural de un genotipo de los individuos de una población por muchas generaciones, el nivel de variación genética resulta de la presión de selección natural y de otras formas evolutivas, como la mutación, la deriva genética y la migración. El nivel de diferenciación entre poblaciones depende de las especies, de la variación ambiental y de la distancia geográfica.

Reyes (2002), menciona que en 1934 Flous realizó una descripción de 11 taxas de *Pseudotsuga* existentes en Norteamérica, separando a la mayoría de ellas del complejo *Pseudotsuga taxifolia*, después Martínez en 1963, hace una descripción de las especies encontradas en México, aceptando la descripción

realizada por Flous, y reportando la existencia de cuatro especies (*Pseudotsuga rehderi*, *P. flahaulti*, *P. guinreri* y *P. macrolepis*) estas descripciones se basaron solamente en características morfológicas y anatómicas, y debido a la estrecha similitud en las características que existen entre los taxos y al traslape en sus áreas de distribución, los taxónomos norteamericanos y de otros países no aceptaron estas especies. No obstante, ellos consideran que las diferencias morfológicas de las poblaciones mexicanas son consecuencia de variación clinal y ecotípica entre las mismas y que estas poblaciones pertenecen a *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Little, 1979). Reyes (2002), menciona que la variabilidad morfológica de las poblaciones está asociada con la región geográfica de origen y no a los taxos propuestos por Flous en 1934 y Martínez en 1963. Sin embargo, las poblaciones del centro del país se separaron de las poblaciones del NE y NO de México, y una localidad del noreste del país se separó del resto de las localidades dentro de su misma región geográfica, formando un grupo distinto, dando lugar a una discusión sobre el posible efecto de la selección y deriva genética sobre la diferenciación morfológica y el patrón de agrupamiento de las poblaciones entre y dentro de las regiones geográficas. Cabe aclarar que para este trabajo se aceptó la clasificación por Flous (1934) y Martínez (1963), para *Pseudotsuga macrolepis* Flous, la cual se ubica en el centro de la República Mexicana.

3.3.3. Descripción del género *Pseudotsuga* Carr.

Rzedowsky (2001), describe al género *Pseudotsuga*, como un árbol que pertenece al Orden Coníferas y a la familia Pinaceae, con una altura de 12 a 15

m, a veces llegan a medir hasta 35 m; el tronco tiene de 30 a 50 cm de diámetro, sus ramas son subverticiladas o irregularmente dispuestas formando una copa más o menos cónica y regular; las **hojas** miden de 15 a 25 mm de largo, las cuales están protegidas por brácteas de color café oscuro en la base y café claro en el ápice; los **conos** son ovales u ovoides, miden de 5.5 a 8 cm de largo por 3.5 a 4 cm de ancho, presentan de 25 a 30 escamas fértiles, de color café-rojizo oscuro y presentan un pedúnculo de 8 a 10 mm de largo, las escamas son subrómicas o suborbiculares no auriculadas, cóncavas, grandes y gruesas, miden 25 mm de alto por 20 a 25 mm de ancho, las brácteas miden de 25 a 30 mm de largo por 5 mm de ancho, con el borde rasgado hacia la parte superior y la punta central saliente, las puntas laterales no sobresalen.

3.3.4. Descripción de *Pseudotsuga macrolepis* Flous.

Rzedowsky (2001), mencionan que la especie *macrolepis* F. es un árbol de 12 a 15 m de alto, el tronco mide de 35 a 50 cm de diámetro, con ramas subverticiladas o irregularmente dispuestas, las inferiores extendidas y las superiores ligeramente levantadas, formando una copa irregular no rala, la corteza es de color grisáceo en el exterior y rojizo en el interior, de 15 a 25 mm de espesor, áspera y hendida, dividida en pequeñas placas irregulares, dentro se forman zonas de color amarillo, algunas duras y otras oscuras y bofas, dispuestas irregularmente. Las últimas ramillas son alternas y en varios casos opuestas, de color rojizo cerca de la extremidad; la superficie hirsuta, con pubescencia esparcida y corta. Las hojas son delgadas, las inferiores subdísticas, y las de la parte superior están orientadas en todas direcciones:

son rectas o levemente falcadas lineares, miden de 15 a 25 mm de largo por 1.25 a 1.40 mm de ancho, son de color verde claro, a veces algo amarillentas, glaucas en la parte inferior; el ápice es obtuso o agudo y en ocasiones redondeado, la base es un poco retorcida; y tiene una hendidura longitudinal en la cara superior, llegando hasta la extremidad y una cresta poco prominente en la cara inferior, las yemas son largamente ovoides de 5.5 a 7 cm de largo, algunas veces hasta de 8 cm por 3.5 a 4 cm de diámetro, con 23 a 25 escamas fértiles; de color café oscuro poco rojizo, con pedúnculo delgado de 8 a 10 mm de largo.

Las escamas son subrómicas, a veces suborbiculares, no auriculadas, cóncavas, grandes y gruesas, estriadas en la cara externa; miden unos 25 mm de alto por 20 a 24 mm de ancho.

Brácteas de los conos son de 27 a 30 mm de largo por 5 mm de ancho, con la punta central sobresaliendo unos 5 mm y las laterales no salientes, con el borde rasgado hacia la parte superior; en general son derechas pero en ocasiones y sobre todo en árboles viejos, se observan reflejadas hacia la base del cono, y estos.

3.3.5. Descripción general de la madera

Camacho, citado por Acevedo (1998) menciona que la madera presenta anillos de crecimiento, canales resiníferos; el diámetro de las traqueidas es mediano, con pared delgada y forma rectangular; tiene rayos uniseriados, homogéneos, poco numerosos y muy bajos; en el corte radial presenta puntuaciones en el campo de crecimiento piceoides y en la pared de traqueidas areoladas. Tiene

color 10YR6/6, de lustre medio, textura fina, hilo recto, veteado pronunciado, dureza blanda y densidad semipesado

3.3.6. Semilla

La semilla es ligeramente ovoide o subtriangular, de 5 a 7 mm de largo por 3 a 4 mm de ancho, aplanada en cara y convexa en la otra, donde queda envuelta por la base del ala, de color café opaco en la cara plana y castaño en la convexa; el ala es de 15 a 16 mm de largo incluyendo la semilla (Mápula, 2004)

3.3.7. Anatomía de la semilla

Niembro (1986) menciona que la variación morfológica que tienen las semillas de los pinos, en su anatomía es básicamente la misma en todas las especies, esto se tomo como base de descripción para la semilla de *Pseudotsuga*.

Mirov (1967), menciona que la semilla madura está compuesta por un embrión inmerso en el tejido del gametofito femenino. Tanto el embrión como el gametofito femenino se encuentran firmemente cubiertos por los tegumentos, en *Pseudotsuga*; a) Partes de la semilla: (Mi) Micrópilo, (Su) Suspensor, (MGF) Megagametofito femenino, (Em) Embrión; (Ti) Tegumento interno y (CS) Cubierta seminal; b) Partes del embrión: (Me) Meristemo apical o Plúmula, (Co) Cotiledones, (H-R) Eje Hipocótilo-Radícula y (Su) Suspensor.

El embrión está constituido por un verticilio de cotiledones u hojas embrionarias, el número va de 4,12 o más, los cotiledones rodean a su estructura cónica formada por tejido meristamático llamado también plúmula o epicótilo, está estructura da origen tanto al tallo de la plántula como a sus hojas primarias.

Después sigue el hipocótilo, esta es la región de transición entre el tallos y la raíz, en la región inferior al hipocótilo se localiza la radícula, la cual está formada por tejido meristemático y da origen a la raíz primaria de la plántula, y en el extremo radicular del embrión se encuentran células del suspensor, en forma de filamento delgado y enrollado (Niembro, 1986).

3.3.8. Hábitat

Rzedowski (2001) y McDonald (2000), mencionan que el género *Pseudotsuga* se puede encontrar en altitudes desde los 2000 a los 3200 msnm, en sitios sombríos y húmedos a lo largo de corrientes de agua y barrancas con pendientes de 35 a 60%, o en valles protegidos y con una exposición Norte, Noroeste y Noreste, por lo general ocupan superficies muy reducidas en medio de pinares y muchas veces se presentan como masas mixtas principalmente con *Abies*, *Pinus*, *Quercus*, *Abies*, *Cupressus*, *Lonisera*, *Ribes*, *Senecio*, *Vicia*, *Pteridium*

3.3.9. Clima

Domínguez (1994) y Acevedo (1998), menciona que el género *Pseudotsuga*, tiene un amplio rango climático, aunque la mayoría de los autores coinciden que este género se debe a efectos microclimáticos, que se originan por la fisiografía y las exposiciones dominantes al Norte, donde se genera mayor humedad en su interior y en el suelo, con una mínima insolación, los

movimientos reducidos del viento y de la sombra en la mayor parte del día (ver cuadro 2).

3.3.10. Suelo

En general los suelos donde se encuentra *Pseudotsuga* en México, son poco desarrollados, delgados, pedregosos, de pH ácido a alcalino, con un contenido de materia orgánica que va desde bajo a abundante y de fertilidad limitada Acevedo (1998).

Cuadro 2. Climas donde prospera *Pseudotsuga* en México. (Domínguez ,1994)

Lugar	Tipo Climático	Temperatura Media anual (° C)	Rango de precipitación anual (mm)	Rango Altitudinal (msnm)	Exposición
Chihuahua	Cw C(w2)(b)(e)	12	500-700	1800-2500 2250-2700	Norte, Noreste y Noroeste, con pendiente de 35 a 65 %
Sonora		15.65	956.2	1524-2743	Norte con pendientes de 60 % a >100%
Nuevo León	Cw bn Clima frío y subhúmedo	8.3	> 1000	2500-3470	Noreste
Coahuila	Semiárido y mesotermal. Con deficiencia de lluvia en todas las estaciones del año.	11.25	1200-1800	1500-2800 Hasta los 2300	Norte
Río Bavispe, Sonora	Cw	10	475-650	1800-2100	
Durango	Cwb Frío subhúmedo	16	600-800	2500-3150	Norte y Noreste
Sierra de la Marta, Arteaga, Coahuila.	Bw y Cx clima seco para el sotavento de la sierra BS1 y C (w1).	18.25	319.3-633.7	2300-3600	
Huyacocotla, Veracruz	C(w2) templado con subhúmedo, lluvias en verano	13.55	633.9-1358.1	2420-2660	Norte, Noreste y Noroeste; con pendientes de 30 a 85 %
Presa Jaramillo, ejido, El Cerezo, Pachuca, Hgo.	Cb(w2)igw" Clima templado con verano fresco y largo	12.1	859.0	2800-2900	Noreste
San Juan, Municipio de Terrenate, Tlax.	Cb(w1)wig, clima templado con verano fresco y largo	14.7	646.5	3000-3100	Norte
Rancho Pardo, municipio de Tlaxco, Tlax.	Cb(w1)(w)igw"	13.6	679.8	2900	Noreste

3.4. Actividades de conservación *in situ*

Para la conservación *in situ*, de algunas especies amenazadas, han orientado ciertas superficies de terreno a las llamadas Áreas Protegidas Naturales, por medio de decretos y acuerdos, federales, estatales o regionales, cuyo objetivo es mantener la estructura y los procesos ecológicos, salvaguardando la diversidad genética de las especies silvestres, especialmente de las endémicas, amenazadas o en peligro de extinción (CONABIO, 2002). Sin embargo estas áreas aún no cuentan con un programa de manejo y estructura administrativa que garantice, una conservación adecuada a largo plazo, debido a que no hay suficientes recursos humanos para llevar a cabo la administración y manejo de estas. Sin embargo es una forma de salvaguardar especies que han sido sobre explotadas y en peligro de extinción como es el caso de *Pseudotsuga*, (NOM-059-(ECOL-1994).

3.5. Actividades de conservación *ex situ*

Debido al interés por establecer plantaciones forestales comerciales en diferentes lugares del país y la necesidad de iniciar programas de restauración y protección ecológica, se ha ocasionado una demanda de germoplasma forestal, esto dio lugar a la creación de bancos de germoplasma forestal, a nivel operativo y no a nivel de investigación (Talavera y Aguilera, 2001). Pero solo algunos bancos han logrado tener las condiciones adecuadas para la conservación a largo plazo de los recursos genéticos, la mayoría de estos se concentran en la región norte y centro del país, aunque su diversidad genética de especies no está bien representada en sus colectas almacenadas.

3.6. Plantaciones de conservación.

Esta alternativa es muy importante, especialmente cuando se trata de especies que tienen una distribución natural restringida o donde el hábitat natural se encuentra seriamente amenazado. Por lo que algunas empresas privadas e instituciones públicas adicionaron algunas plantaciones a las existentes con *Pinus greggii*, *Pseudotsuga*, y otros géneros con el objetivo de conservar y producir semilla (ver cuadro 3). En *Pseudotsuga*, la producción de árboles de navidad, ha ocasionando una demanda de semilla enorme, la cual es difícil de abastecer con las reducidas poblaciones naturales existentes (Vargas, 2003)

Cuadro 3. Especies nativas con prioridad en la región Norte de México (Vargas, 2003)

Género y especie	Género y especie
<i>Acacia farnesiana</i>	<i>P. leiophylla</i>
<i>Alnus firmifolia</i>	<i>P. maximartinezii</i>
<i>Amphipterygium adstringens</i>	<i>P. oaxacana</i>
<i>Bursera simarouba</i>	<i>P. oocarpa</i>
<i>Cedrela odorata</i>	<i>P. patula</i>
<i>Cordia alliodora</i>	<i>P. pringlei</i>
<i>Cupressus guadalupensis</i>	<i>P. radiata</i>
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	<i>Populus</i> spp.
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Prosopis laevigata</i>
<i>Liquidambar styraciflua</i>	<i>Pseudotsuga</i> spp.
<i>Pinus ayacahuit.</i>	<i>Rhizophora mangle</i>
<i>P. chiapensis</i>	<i>Swietenia humilis</i>
<i>P. engelmannii</i>	<i>Taxus globosa</i>

Otra opción para la conservación ex situ, es por multiplicación *in vitro*, donde se puede establecer la manipulación de plantas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, en medio nutritivo y en condiciones estériles. Esta

técnica es de gran importancia en la horticultura, en el cultivo de plantas ornamentales y en su mejoramiento genético, sus aplicaciones se extiende a cultivo de embriones, germinación de semillas, clonación, producción de plantas libres de enfermedades, micropropagación, variación somaclonal, manipulación genética, entre otras (Pierik, 1994).

3.7. Problemática de propagación y mejoramiento de *Pseudotsuga*

Uno de los grandes problemas para la propagación y mejoramiento del género *Pseudotsuga*, es la calidad de la semilla, Mápula (2004) menciona que encontró un contenido de humedad de la semilla mayor al recomendado para el almacenamiento, y lotes de semillas con baja viabilidad y alto porcentaje de embriones inmaduros, en particular en lotes provenientes del centro del país, y que probablemente se deba a niveles altos de autofecundación, cruzamiento de individuos relacionados genéticamente, este último provoca la baja producción de semilla, una alta proporción de semillas vanas y óvulos abortivos, esta situación puede estar asociada con una escasa polinización debido a la participación de un número reducido de individuos en la producción o al cruzamiento entre ellos, también las colectas tempranas o secado de conos en condiciones no propicias, provocan que la semilla pierda viabilidad.

Otro problema que existe, es que *Pseudotsuga*, presenta una amplia diferenciación entre las poblaciones, con respecto a la fenología de la yema terminal; sin embargo, no existe un patrón geográfico bien definido, y las poblaciones del norte tienen una estacionalidad diferente a las del centro del país; y el gradiente ambiental es más notorio en la fecha de inicio del

crecimiento que se asocia de forma negativa con la altitud del sitio de origen, así también la disponibilidad de nutrimentos afecta el patrón fenológico de la yema terminal; una dosis elevada de nutrimentos adelanta el rompimiento y retrasa la formación de la yema terminal, reduciendo la heterogeneidad de los eventos fenológicos entre las plantas, esto influye de forma importante en el manejo de germoplasma y en la producción de plantas en vivero, que al establecer plantaciones de *Pseudotsuga* fuera de su hábitat natural se puede afectar la productividad y supervivencia (Acevedo, 2004).

3.8. Aplicaciones de la Biotecnología en los Recursos Forestales

La FAO (1994) describe a la "Biotecnología como un conjunto de tecnologías, que no necesariamente están confinadas al cultivo de tejidos y a las técnicas de ADN recombinante, las cuales utilizan organismos vivos (o partes y sustancias obtenidas de organismos), para explotar y modificar organismos de tal manera de producir nuevos productos, bienes y procesos, y que estos desarrollos sirvan para superar enfermedades, plagas y limitantes ambientales de la producción o mejorar la calidad y cantidad de los productos".

A medida que la población va aumentando, la demanda de productos forestales también, y para principios del próximo siglo hay previsiones de escasez. Los programas tradicionales de mejoramiento de plantaciones están creciendo en el mundo industrializado, mientras que los esfuerzos se han retrasado en los países en desarrollo, siendo precisamente allí donde se sentirán las carencias más graves, la baja disponibilidad de tierras y la falta de prácticas ecológicas adecuadas, hace que surja la necesidad y la esperanza de que la investigación

aumente la productividad, calidad y conservación de los árboles que tienen importancia económica y ecológica, como *Eucalyptus*, *Pinus*, *Acacia*, etc., a pesar de todo las prácticas tradicionales de la silvicultura y de mejora de árboles siguen siendo importantes; sin embargo, se ven limitadas por el largo ciclo de vida de los árboles forestales. En su sentido más amplio, la biotecnología ha permitido manejar los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad, incluyendo los métodos convencionales de citogenética, cultivo y técnicas para superar las limitaciones biológicas, estas incluyen: cultivo de células y micropropagación, selección genotípica y conservación *in vitro*, y un gran número de tecnologías en el campo de la genética molecular (Watt *et al.*, 1991, 1995).

3.8.1 Estudios de Cultivo *in vitro* de células y tejidos de Coníferas

3.8.1.1. Cultivo de células en suspensión

Este consiste en la división rápida de células activas homogéneas, las cuales crecen en un medio de cultivo líquido gaseoso. Este tipo de cultivo es una herramienta importante para la silvicultura comercial, su uso encierra la inserción e integración de genes extraños, a través de crioalmacenamiento del germoplasma y en sistemas para el aislamiento *in vitro* de líneas mutantes, para una selección de fenotipos resistentes y tolerantes al estrés (Vander, 1991), y en la producción automatizada a gran escala de embriones somáticos, nacidos de los cultivos de células en medios líquidos, este último simboliza un camino potencial para la multiplicación vegetal a bajo costo y un modo de superar el problema del desarrollo asincrónico de los embriones, que se da cuando se

utiliza un medio sólido (Watt *et al.*, 1991), este método ha sido empleado para la propagación de *Pinus strobus*, en la transformación genética del tulipero, en la crioconservación de *Picea sitchensis* y para obtener una variedad de eucalipto puro y líneas híbridas entre otros.

La silvicultura en la actualidad enfrenta el conflicto de maximizar los beneficios genéticos y minimizar la erosión genética, así misma la variación genética debe ser extensa para permitir aumentos en las generaciones, con el fin de cumplir con ciertos objetivos como en sistemas de ordenación o para el manejo de enfermedades, adjuntando el largo ciclo de desarrollo de los árboles, ocasionó el uso de grandes cantidades de tierras para el almacenamiento de genotipos “potencialmente útiles” por parte de la industria forestal, sin embargo algunos de estos genotipos se pierden por la ocurrencia de peligrosos acontecimientos ambientales, que originan la pérdida de germoplasma o del material de producción. En algunas industrias se están utilizando técnicas de micropropagación como parte de su producción, alcanzando una calidad deseable para el trasplante, mediante el almacenamiento *in vitro* del germoplasma de interés, bajo sistemas de almacenamiento de crecimiento mínimo con una temperatura inferior a 10°C, reducción del nivel de oxígeno, nutrientes reducidos, etc. Sin embargo, esto se ve limitado por el tiempo que permanezcan en el cultivo, y perder la capacidad de regeneración después de pocos meses. Mientras que en la crioconservación (-196°C) los procesos metabólicos y la deterioración biológica se detiene y (teóricamente) el material biológico puede ser almacenado indefinidamente, utilizando yemas axilares, trozos de callos, alícuotas de cultivos de células en suspensión y polen (Kantha

y Grout, 1985), esto implica un pre-cultivo en un medio apropiado, deshidratación a bajo contenido de humedad, sin la pérdida de la viabilidad y tratamiento con crioprotectores (glicerol, sulfóxido de metilo, sacarosa) (Karthä y Grout, 1995).

3.8.1.2. Marcadores genéticos

Las prácticas de campo y la evaluación de las plántulas somáticas en su fidelidad genética son de gran importancia, sin embargo su evaluación se ve limitada por una baja tasa de germinación de los embriones somáticos. Los ensayos de campo dirigidos por Weyerhaeuser Inc. EE.UU de *Picea* y Pino Douglas, mostraron que durante el primer año, los clones tenían un crecimiento uniforme. Actualmente, estas prácticas de campo están siendo dirigidas por algunas compañías papeleras en EE.UU., Canadá y Nueva Zelanda en clones de coníferas, y los resultados preliminares a estas practicas presentaron variaciones morfológicas en las plántulas, por lo que es importante mantener la fidelidad genética y por su largo ciclo de vida, algunos cambios genéticos no pueden ser observados a simple vista, por consiguiente los marcadores moleculares como el ADN (RAPD), RFLP y AFLP, analizan e identifican las variantes genéticas que se presenten en las plantas (Jain e Ishii, 1998). Una es la variación somaclonal causada por la heterogeneidad de los cultivos embriogénicos de las coníferas.

3.8.1.3. Transformación genética

La destreza de manejar genéticamente las especies de árboles forestales tiene grandes aplicaciones potenciales, en los últimos años ha habido una serie de informes de expresión exitosa transitoria de genes introducidos en varios sistemas de cultivo de eucalipto (Teulieres *et al.*, 1993); sin embargo, los esfuerzos se han limitado en las especies forestales, sobre todo en la producción de plantas obtenidas genéticamente y en el aislamiento de genes funcionales y económicamente útiles.

En especies que sean realizado trabajos para transformación genética a través de cultivo de embriones somáticos son *Picea*, *Pinus*, *Larix*, *Populus*, *Eucalyptus*, entre otras, hasta ahora pocos genes de importancia se han incluido, como el de la lignificación, el rolC, el de resistencia a insectos, el de esterilidad reproductiva, el de resistencia a sequía y el de resistencia a herbicidas, estos han sido implementados usando varios métodos de transformación como la biobalística, y cultivos de células utilizando procedimientos mediados en *Agrobacterium*, el gen transferido puede causar una anomalía inmediata o puede permanecer inactivo por un largo tiempo y activarse bajo ciertas condiciones favorables o incluso podría perderse durante la larga fase vegetativa de los árboles. Por consiguiente, es bastante difícil predecir a futuro la conducta de un gen transferido (Jain, 1999).

3.8.1.4. Estudios de cultivo *in vitro* de Coníferas

Los trabajos pioneros en el cultivo de tejido cambial de especies leñosas, se inicia en 1940 con el cultivo de yemas adventicias de *Ulmus campestris*,

mientras se informaban más éxitos en la producción de latífoliadas a través de tallos y raíces, durante esta década y fue a finales de ella cuando se reporto el primer trabajo en organogénesis en coníferas (*Sequoia sempervirens*), y las primeras plántulas completas obtenidas por organogénesis para angiospermas y gimnoespermas fueron *Populus tremuloides* y *Pinus palustris*. Actualmente, en el área forestal se está logrando una mayor producción de genotipos, utilizando la micropropagación para desarrollar protocolos de producción y rentabilidad para numerosas líneas puras e híbridas, en árboles que tienen valor industrial, e.g. en la producción de clones de *Eucalyptus*, mientras que en algunas especies de pinos aun son de interés de investigación, (Debergh 1993).

3.8.1.5. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática o producción de estructuras, también conocida como embriogénesis asexual o adventicia, consiste en desarrollar *in vitro*, embriones a partir del cultivo de células que no son el producto de una fusión gamética, para formar embriones bipolares, con una conducta de formación similar a la embriogénesis cigótica. Se pueden obtener embriones somáticos de diferentes partes de la planta, como ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y todos los órganos y tejidos con características embrionarias, meristemáticas y reproductivas (Sánchez, 2000).

En el cultivo *in vitro* existen dos tipos de embriogénesis somática la directa y la indirecta. En la forma directa se implica la existencia de células somáticas predeterminadas a continuar la vía embriogénica y las células se desarrollan para la formación de embriones. Mientras que en la forma indirecta, para que

las células sigan la vía embriogénica, pasan por una fase prolifera de formación de callo y cambian su competencia a la expresión de embriogénesis. Este proceso ocurre en dos fases: En la primera fase las células aisladas en medios con auxinas, forman grupos de células embriogénicas; en la fase dos, los grupos de células embriogénicas son subcultivados en un medio sin auxinas, estos proliferan de forma lenta e indiferenciada, produciendo una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico, formando embriones globulares, y pasan por los estados de corazón y torpedo, hasta madurar y formar plantas completas (Agúndez *et al.*, 1999).

El beneficio más significativo, es que mientras el sistema de radicación producido mediante organogénesis es adventicio, los propágulos desarrollados de los embriones somáticos tienen sistemas de raíz principal. Otras ventajas son el potencial de producir grandes números de propágulos, la inducción del reposo vegetativo y del almacenamiento a largo plazo y la posibilidad de encapsulación con alginato de sodio de los embriones somáticos obtenidos (Grout, 1995). En el área forestal se han desarrollado métodos para la producción de embriones somáticos, e.g. en *Eucalyptus* utilizando como explantes secciones de hojas. (Watt *et al.*, 1991), y los primeros propágulos obtenidos por medio de la embriogénesis somática, se plantaron y florecieron una estación antes, que las plantas producidas por semillas.

La multiplicación asexual para maderas duras y suaves utilizando el método de cultivo de tejidos en árboles, se ha logrado, por cortes de yemas axilares, producción de yemas adventicias y embriogénesis somática.

En los últimos 20 años se han completado protocolos para la micropragación de algunas especies leñosas, en las que se encuentran más o menos 70 angiospermas y 30 gimnospermas (Debergh, 1993). Por otro lado, existen investigaciones preliminares utilizando como explante embriones de *Pinus patula* (McKeller *et al.*, 1994).

Salajova (1996), reporta que el potencial embriogénico de los callos a partir de megatofito femenino como explante, de híbridos de *Abies alba* Mill x *Abies cephalonica* Lend. y de *Abies alba* Mill x *Abies numidica* De Lann, depende del genotipo, del tiempo de colecta, del medio de cultivo y del explante; sin embargo, para ambos híbridos, el potencial embriogénico es alto a principios de julio, mientras que al utilizar cortes de cotiledones de embriones cigóticos maduros, los resultados no fueron satisfactorios para la inducción de la embriogénesis. Usando el medio SH con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (6-Bencilaminopurina), menciona que es más eficiente para la formación y crecimiento de callos, y formación de embriones somáticos y la maduración de los embriones la detectó con la formación de estructuras bipolares con tallo y ápices de raíz, también menciona que las reservas alimenticias se observan en células de embriones cultivados en medio DCR con $1.0 - 10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABA (Ác. Abscísico), sin embargo, al cultivar los embriones en el mismo medio, pero sin ABA no germinan.

No obstante, algunas de las aplicaciones mayores de la embriogénesis somática es la Cryopreservación para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma de élite, para ser usado en el futuro, así también el uso de

Bioreactores en los cultivos de embriogénesis somática, para la producción de semilla somática, en el control de calidad. Varias compañías de papel hacen uso de bioreactores para una producción masiva. Esta tecnología todavía esta en fase de desarrollo, para la mayoría de los árboles forestales, debido a que las plantas leñosas normalmente son recalcitrantes (Watt, 1999).

López (2000), reporta en sus estudios con *Picea chihuahuana*, que al cultivar embriones maduros (Cigóticos), observó que la Kinetina (K) promovió los mismos modelos celulares y el desarrollo de brotes, mientras que en tratamientos con BA (Bencilaminopurina), los resultados fueron los mismos, pero en menos tiempo, y el tiempo mínimo requerido para la inducción de yemas adventicias con K/2,4-D (Ác. 2-4 Diclorofenoxiacético) es de 14 días, y 17 días con BA(6-Bencil Adenina)/ANA (Ácido Naftalen Acético); y el tiempo óptimo de inducción para generar una alta cantidad de yemas fue de 21 a 30 días, y que esto indicó que los embriones maduros cultivados *in vitro* requieren de más tiempo de exposición en el medio para desarrollar yemas adventicias y que esta respuesta, se deba tal vez a una expresión morfogénica la cual reduce su capacidad para el desarrollo de yemas. Otro problema al que se enfrento fue al necrosamiento, enjuagando los explantes con una solución con antioxidante, antes de cada subcultivo.

Mientras que Monjarás *et. al* (2000) menciona que en embriones maduros disectados de *Pseudotsuga.macrolepis*, cultivados en medio SH (Schenk y Hildebrandt, (1972) con ANA/BA o 2,4-D/K(Kinetina) en diferentes concentraciones, formaron protuberancias nodulares en los cotiledones y en la porción superior del hipocótilo, las cuales dieron origen a brotes adventicios,

también reporta que los embriones cigóticos comienzan a formar embriones entre la cuarta y sexta semana, sin embargo un problema al que se enfrentó fue al inducir el enraizamiento en los brotes, al usar diferentes reguladores de crecimiento, sustratos y temperaturas de incubación, obtuvo la formación de primordios radicales en 8 brotes y en dos se formaron raíces espontáneas.

Arya (2000) menciona que se pueden obtener callos de embriones cigóticos de *Pinus roxburghii*, con diferentes etapas de desarrollo, cultivados en medio (DCR) con 2,4-D, ANA, y BA, observó que los embriones inmaduros desarrollaron callos más rápidamente en el megagametofito femenino, y el suspensor se estiro hacia el medio. Los callos desarrollados formaron pro-embriones con 6 a 8 células meristematicas y durante la proliferación de callos, se forma una hendidura poliembrionaria la que permite constituir un método de multiplicación de embriones somáticos.

Tang (2001a) menciona que la regeneración de plántulas a partir de embriones cigóticos de *Pinus taeda* L. cultivados en ocho formulaciones diferentes de sales básicas, adicionados con 2,4-D, BA, caseína hidrolizada y L-glutamina, en un periodo de 9 semanas, el tejido embriogénico se formó en los cotiledones, hipocótilo y radicales de los embriones cigóticos, formando callos, que al ser subcultivados en un medio con auxinas y citocininas con una concentración de 1/5 y permaneciendo por un periodo de 9 semanas, formaron masas embriogénicas suspensoras, y la más alta formación de tejido embriogénico fue de un 17 % en medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 %, las masas embriogénicas al ser subcultivadas en medio líquido con ABA, glicol polietileno

y carbón activado formaron embriones somáticos, los cuales germinaron en un medio con AIB (Ác. Inol-Butirico), Ác. giberelico (GA₃), BA, carbón activado y sacarosa a la mitad de su concentración. Los embriones germinaron en un periodo de 4 a 12 semanas. Las plántulas obtenidas se adaptaron en sustrato de Peatmoss, Vermiculita y perlita (1:1:1) y en campo sobrevivieron únicamente 73 plantas.

Tang (2001b), reportó que la inducción de la organogénesis somática directa en *Pinus taeda* L., resultó de la formación de múltiples tallos inducidos en cotiledones e hipocotilo de embriones cigóticos maduros, en un medio con 2,4-D, ANA, BA y KIN, durante 2 y 3 semanas. Formando en promedio 32.6 tallos adventicios por embrión cigótico, y la formación de raíces de las plántulas se logro en medio TE con IBA, GA₃ y BA. Sin embargo, Valdés (2001) menciona que al aislar los cotiledones de embriones que germinaron, en medios: LP modificado (Le Proive) a un ½; LPB modificado (Le Proive) a un ½ + BA (6-Bencil Adenina)y LPC modificado (Le Proive) adicionando con carbón activado; reportó que las curvas de dosis-efecto de BA explicaron la pérdida del potencial caulogenico en la edad de los explantes, y que esta se debe a la combinación de dos factores; a los cambios en el volumen hormonal endógeno en el explante y a la pérdida de su sensibilidad exogena al aplicar BA, los cuales son causantes de la reducción en la habilidad de los cotiledones para formar yemas adventicias.

Pullman (2003), reportó que al compara la calidad, la morfología, peso seco, capacidad de germinación y el gen de expresión entre embriones cigóticos y embriones somáticos producidos *in vitro*, concluye que los embriones somáticos

al ser inducidos a la maduración, crecen solo la mitad, y al compararlos con una secuencia normal de desarrollo, y su crecimiento es discontinuamente prematuro. Sin embargo, aunque se presenten ciertas limitantes, la embriogénesis somática es una técnica exitosa y de gran importancia comercial para la producción en *Pinus taeda* L.

La edad de los explantes, también tiene gran influencia en la embriogénesis somática, estudios realizados con *Larix decidua* de 42 años, mostraron que los efectos de 2 medios (AFC y ELS) de cultivo en la formación aparente de estructuras embrionarias reportaron que el mejor medio fue el AFC, bajo en $\text{NH}_4\text{-NO}_3\text{+SO}_4^{2-}$, pero alto en PO_4^{3-} , comparado con el otro medio, sin embargo en ambos medios se inició la formación de estructuras durante el verano, pero el medio ELS tuvo menos efecto en la producción de estructuras (Bonga ,2004).

Uno de los problemas que se presentan en las plántulas de coníferas, obtenidas *in vitro* es la formación de raíz en el medio de cultivo, sin embargo estudios realizados en *Argania spinosa* L, mencionan que las plántulas subcultivadas en medio MS (1962) a la mitad de su concentración adicionado con una combinación de IBA y ANA, en concentraciones iguales ($5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), bajo condiciones de oscuridad durante 14 días, obtuvo una inducción de raíz en un 85% con una media de 16 raíces por explante y al aumentar la concentración a $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, las raíces secundarias aumentaron en un 12 %. Las plántulas con raíz, las pasaron en sustrato compuesto de fibra de coco (80 g), con el medio

semisólido (35 mL) y gelosa ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), donde crecieron las raíces primarias y secundarias (Bousselmame, 2001).

3.8.1.6. Organogénesis

Los primeros acercamientos a la formación de plántulas vía organogénesis fue a través de la producción de tallos unipolares, los cuales pueden enraizar en diferentes estados.

McCown y McCown (1987) mencionan que el método de rompimiento de yemas axilares ha sido utilizado en tallos, yemas laterales y en pequeños cortes nodales, para maderas duras y suaves; sin embargo, es muy difícil estimular yemas axilares en coníferas, por su tardado crecimiento, aun así, este método es utilizado con éxito en algunas especies de Pinos en etapa de juvenilidad, pero solo se pueden formar bajos números de plantas de las cuales es difícil lograr su enraizamiento, y por el contrario las yemas axilares han sido útiles para la multiplicación en angiospermas, con árboles maduros.

Para la inducción de tallos en gimnospermas o angiospermas, se utiliza comúnmente BA (utilizada en *Pinus pinaster* y *Betula platyphylla*, con concentraciones de calcio arriba de $25 \mu\text{M}$. en sales MS (1962) o medio vegetal leñoso (WPM, 1980), que es más usado para angiospermas, sin embargo el uso de las sales minerales en maderas suaves son mucho más variables y contienen bajos niveles de nitratos, que los que se encuentran en las sales MS (1962) y en el WPM con concentraciones de 0.1 a $1.0 \mu\text{M}$ de BA, estas han

sido optimas para la inducción de tallos en maderas duras, adicionando también las condiciones ambientales requeridas por las plantas (Debergh, 1993).

Ahuja (1996), menciona que al utilizar el cultivo de tejidos para regenerar plantas de *Sequoia sempervirens* D.Don, usando como explante yemas de árboles de 8 y 25 años de edad, cultivados en medio WPM (Lloyd and McCown 1981), con concentraciones bajas de BAP (0.2 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), se formaron brotes en 12 semanas y sin embargo, la inducción de raíces, fue mínima y se dió en un medio libre de hormonas y en un medio con una concentración de BAP al $0.002 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y las plántulas que se pasó al sustrato de turba con perlita, tuvieron un 20 % de formación de raíces.

3.9. Medio de cultivo

El crecimiento *in vitro* y desarrollo de plantas esta determinado por un determinado número de factores, como la estructura genética de la planta, los nutrientes (agua, macro y micro elementos y azucares), interviniendo también los factores de desarrollo físico: luz, temperatura, pH, oxígeno, y la concentración de bióxido de carbono, más algunas sustancias orgánicas (reguladores, vitaminas, etc.). Varios medios incluyen las formulaciones derivadas de White, Murashige y Skoog, y Gamborg (B5). Sin embargo, para muchas especies leñosas sensibles a sales, se usa un medio bajo en sales como el Woody Plant Médium (WPM) (Pierik, 1990).

En el caso de algunas coníferas, el medio puede ser líquido, sólido o semisólido, estudios con *Pinus taeda* L. (Gupta y Grob ,1995), observaron que

en los cultivos para inducir la embriogénesis, no pueden mantenerse durante mucho tiempo, debido a que el cultivo sufren un proceso de envejecimiento y a menudo muestra un declive en el potencial embriogénico, por consiguiente es esencial un intervalo de subcultivo en medio fresco en 2 a 3 semanas.

Los medios de cultivo para la proliferación de embriones requieren auxinas y citocininas (Von Arnold *et al*, 1995). Sin embargo, cuando solo están presentes auxinas los embriones permanecen blancos y translúcidos, Bellarosa *et al* (1992), notó que con citocininas en el medio de cultivo, los embriones aumentaron su tamaño y desarrollo, usando como medios básicos el de MS (1962) y el medio HS (1972) y para controlar la oxidación se le adiciona al medio un atioxidante como el carbón activado (CA).

La adición de CA al medio de cultivo puede tener efectos benéficos o dañinos, los efectos pueden ser atribuidos a tres factores: 1). Oscurecimiento de el medio de cultivo, 2). Adsorción de compuestos inhibitorios y 3) La adsorción de reguladores de crecimiento del medio.

Conger, (1984) demostró que el CA, con 5-hidroximetil-furfural (HMF), inhibe a la mitad el crecimiento en anteras, en el medio de cultivo, aun que parte de la actividad del CA es quitar compuestos inhibitorios y reducir la oxidación (absorbe fenoles), sin embargo es responsable por la inhibición de cultivos que requieren hormonas de crecimiento exógenas, para continuar el crecimiento, Sin embargo, reguladores como AIA (Ácido 3-Indolacético), 2Ip (Isopenteniladenina), ANA, BA y KIN se ligan rápidamente al CA y elimina los compuestos inhibidores de altos niveles de auxinas y citocininas, inhibiendo algunas veces la embriogénesis. Otros autores mencionan que para reducir EL

necrosamiento en explantes de eucalipto, los tejidos deben incubarse en oscuridad, o hacer inmersión de los explantes en pre-tratamientos de soluciones con antioxidantes, así también la reducción de concentraciones de sales en el medio de cultivo, utilizar explantes en estado activo, realizar cultivos subsecuentes, y adicionar al medio L-cisteína (inhibe las enzimas polifenoloxidasas).

3.9.1. Reguladores de crecimiento.

Los reguladores químicos de las plantas son los compuestos orgánicos que en cantidades muy bajas estimulan, inhiben o modifican de alguna forma los procesos fisiológicos de las plantas (sin excluir a las enzimas). Por lo general se considera que los reguladores de las plantas son moléculas pequeñas, entre los reguladores de las plantas se encuentran, las sustancias endógenas, producidas por la planta misma y las exógenas, que son aplicadas desde afuera y con frecuencia son sintéticas.

La acción de los reguladores en la planta depende no solamente de su concentración en los tejidos, también depende de la sensibilidad de los tejidos a la hormona (Leszek, 2003).

3.9.1.1. Auxinas.

El papel que interpretan las auxinas, se genera principalmente en las partes jóvenes de la planta (ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo), estimulando el crecimiento por alargamiento de los tallos y participan también en la formación de las curvaturas fototrópicas (hacia la fuente de luz), gravitrópicas (vector de

gravedad de la raíz o al contrario del tallo), orientando las hojas hacia la luz, formación de brotes laterales, estolones y en la formación de raíces laterales y adventicias (Leszek, 2003).

3.9.1.2. Citocininas

La característica más importante de las citocininas es la estimulación de las divisiones celulares en las plantas, retrasando el envejecimiento, también influyen en la estimulación de la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de diferentes proteínas, integrándose las enzimas como las proteasas y ribonucleasas. Las citocininas son muy importantes en los procesos fisiológicos como la estimulación de la germinación de la semilla, en la necesidad de luz y acortamiento del período de latencia de yemas, también influyen en la regulación de la morfogénesis, suprimen la dominancia apical en las plantas, para inducir la brotación de yemas laterales, en algunas especies, las citocininas participan en la inducción de la floración y en la abscisión de frutos pequeños (Leszek, 2003).

3.9.2. Las auxinas y citocininas en el medio de cultivo.

Skoog y Miller (1986), mencionan que la proporción de auxinas y citocininas determinan el tipo y la magnitud de la organogénesis y no existe una concentración óptima para la inducción de tallos o raíces y las concentraciones dependen de la especie o variedad bajo estudio. Las auxinas más utilizadas son AIA, IBA, 2,4-D, Ác. 2, 4, 5-Triclorofenoxiacético (2, 4, 5-T), Ác. 4-Clorofenoxiacético (CPA), y Ác. 4-Amino-3, 5, 6-Tricloropicolínico (Picloram o

TCP) .Varios ensayos han mostrado que el 2,4-D a presentado de 8 a12 veces más actividad en tallos que AIA, mientras que 2,4,5-T tiene 4 veces de actividad, y CPA tiene 2 veces de actividad, 2,4-D, 2,4,5-T, CPA, y Picloran, son frecuentemente usadas para inducir una proliferación rápida de callos, sin embargo los altos niveles de auxinas en particular 2,4-D tiende a suprimir la morfogénesis, mientras que ANA es menos inhibitoria que AIA. Las Citocininas más utilizadas en el medio de cultivo son: 6-Benciladenina (BA), 6-Bencilaminopurina (BAP), 6- γ - γ -Dimetilalliaminopurina, Isopenteniladenina (2iP, IPA), 6-Furfuril-aminopurina (Kinetina), 6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-buetenilamino) purina (Zeatina) y otras citocininas independientes. Gupta y Pullman, (1991) mencionan que la influencia del potencial osmótico en los reguladores de crecimiento ($0.1-25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABA), e hidratos de carbono inducen el desarrollo y maduración de embriones somáticos en coníferas, aunque observaron que deja de proliferar la producción de embriones somáticos y comienzan a madurar los ya formados

3.10. Incubación o Cuarto de crecimiento.

3.10.1. Luz.

El cultivo de células vegetales en medio de cultivo con sacarosa desvía la necesidad por fotosintetizar, sin embargo las células de numerosas especies se mantienen bajo condiciones de oscuridad. No obstante varios estudios han demostrado que la luz juega un rol importante en la inducción de la organogénesis. Murashige (1986) reportó que la intensidad óptima de luz para

el cultivo de tejidos vegetales puede diferir a partir de los requerimientos de las plantas, reportando que la luz óptima en la etapa I ó II, fue de aproximadamente $20 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y para la etapa III la intensidad varía entre $60 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La alta intensidad de luz ayuda a las plantas a sobrevivir al ser transferidas a suelo y se ha demostrado el efecto en el tipo de crecimiento en el cultivo, al aumentar la intensidad de luz de $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $400 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, causa un incremento en la formación de tallos o incrementa la biomasa. Latkowska (2000) menciona que la influencia de la calidad de luz en la proliferación de tejido embriogénico de tres genotipos de *Pice abies* (L.) K., con diferentes capacidades para producir embriones somáticos maduros, al ser sometidos a luz con lámparas Philips TLD Blanco cálido 36W/29, Philips TLD Azul 18W/18, Philips TLD Rojo 36W/15, Osram L fluorar 36W/77 y Silvana rojo lejano 7080, por 18 hr día con Fotones Flux (PAR) de $30 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Mostraron que el efecto de la calidad de luz en el crecimiento del tejido embrionario, fue fuertemente dependiente del genotipo. En la luz azul y roja se inhibió la proliferación del tejido de los genotipos, mientras que otro genotipo fue casi insensible a la calidad de la luz y creció rápidamente en todas las condiciones de luz.

3.10.2. Temperatura

Estudios sobre la influencia de la temperatura en el crecimiento de células vegetales en cultivos, indicaron que el rango óptimo esta entre 26 y 28 °C, pero los requerimientos difieren considerablemente con la especie, sin embargo, una

temperatura constante para el crecimiento de cultivos vegetales es de 25 °C. Los efectos de la temperatura se reflejan en el tejido cultivado, en algunas especies que requieren de un período frío para superar la dormancia. En cultivos de pinos el crecimiento es por largos periodos de tiempo y de crecimiento retardado de forma gradual. En algunos casos el crecimiento puede ser reestablecido por 2 a 3 meses de tratamientos imitando las condiciones invernales, en *Eschscholzia californica* las semillas requieren de un periodo frío para superar la dormancia, el requerimiento de temperaturas frías también se expresan en el desarrollo de los embriones *in vitro*, dos semanas de tratamientos a 6 °C fueron necesarias para inducir el desarrollo de embriones, los embriones obtenidos presentaron un fenómeno de dormancia muy similar al de la semilla. Un tratamiento con bajas temperaturas pude activar eventos específicos de la morfogénesis

Una temperatura constante entre 18 y 21 °C induce la formación de tallos, pero un pre-tratamiento de 15 a 18 °C por 2 semanas, aumenta el número y el tamaño de los tallos en desarrollo. El cultivo de tejidos vegetales puede ser afectado por alteraciones de los ciclos de temperaturas día y noche y su interacción con los reguladores de crecimiento (Conger, 1984).

3.11. Importancia de las micorrizas

La mayoría de árboles han sobrevivido gracias a una asociación mutuamente benéfica entre las raíces y el hongo. Las raíces micorrizadas tienen mayor capacidad para absorber nutrientes del suelo, que los que están disponibles normalmente en la planta, la multiramificación y crecimiento de las hifas dentro

del suelo incrementan la absorción de agua y nutrientes, especialmente fósforo y por consecuencia las plantas se vuelven más tolerantes a la sequía, a altas temperaturas del suelo y a ciertas toxinas. La micorriza forma además una barrera física alrededor de las raíces que reduce la infección de algunos patógenos. Más del 99 % de las plantas del mundo forman micorrizas en suelos naturales, en suelo forestal productivo, muchas especies de estos hongos, se encuentran en la raíz., cuya función es colonizar biotróficamente, sin causar daño, integrándose hasta a formar parte de ella, al mismo tiempo el hongo coloniza el suelo que rodea la raíz mediante su micelio externo, de forma que ayuda al huésped a adquirir nutrientes, minerales y agua, resultando una asociación mutualista, con hongos de tipo basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos, los cuales se dividen en ectomicorrizas y endomicorrizas

Las Ectomicorrizas se asocian a aproximadamente 2000 especies de árboles como Pinos, robles, Abedul, Haya, Abeto, Sauce, Cedro, nogal, etc. En un bosque maduro se pueden encontrar más de 25 especies de hongos formando ectomicorrizas en un solo árbol, una especie de hongo puede establecer la asociación en varias especies de árboles en el mismo sitio al mismo tiempo (Donald, 2000).

Las Endomicorrizas o vesículas arbusculares (VAM), son las más representativas de las endomicorrizas y a diferencia con las ectomicorrizas solo se conocen 150 especies de hongos VAM, asociados a 300,000 especies de plantas entre estas se encuentran los cultivos agrícolas, frutales, plantas ornamentales, enredaderas, pastos, árboles como el Maple, Olmo, Fresno,

Sicomoro, Nogal, Cerezo, Acacia, Magnolia, Ginkgo, Laurel, entre otros. Los hongos VAM no tienen asociaciones específicas, cualquier especie de estos puede establecer micorrizas con todas las plantas que se asocian a ellos (Minero, 1999)

3.11.1. Asociación entre ecto y endomicorrizas.

Algunas especies de árboles pueden formar ectomicorrizas o endomicorrizas VAM, esto depende de la edad, el sitio y la presencia del inóculo apropiado, sin embargo una planta que carece de micorrizas mejora sus condiciones de vida cuando es inoculada con cualquier especie de hongo y establece una asociación (Minero, 1999).

3.11.2. Uso de las micorrizas

En la actualidad existen una gran cantidad de productos que permiten inocular a las plantas con hongos micorrízicos específicos como *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma* spp, entre otros, que estén ecológicamente adaptados, los productos contienen esporas de cepas de alto rendimiento; con algunas bacterias benéficas que fijan nitrógeno y solubilizan fósforo haciéndolo disponible a las raíces, creando bioestimulantes orgánicos que promueven el crecimiento de la raíz y facilitan la colonización de los hongos micorrízicos; otros productos como los geles que ayudan a la liberación gradual de agua para mantener las raíces húmedas facilitando la colonización de los hongos; los ácidos orgánicos, los quelatos de micronutrientes y surfactantes naturales (PHC, 2004).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

4.2. Procedencia del material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo es semilla con un año de almacenamiento, colectada en el Municipio de Tlaxco, Tlaxcala, ubicado en el Eje Volcánico Transversal, a 19° 31' 12" latitud N, 97° 54' 58" de longitud O y con un rango altitudinal de 2900 msnm.

La zona presenta un clima Cb(w1)(w)igw" (Templado-Frío), con una temperatura media anual de 13.6 °C, y una precipitación anual de 679.8 mm (Acevedo, 2004).

4.3. Pruebas de desinfestación

Con el objetivo de disminuir la contaminación en condiciones *in vitro*, las semillas y los diferentes explantes utilizados, fueron lavados antes con detergente, y posteriormente pasaron por las diferentes pruebas siguientes:

Primera prueba. (A).

En esta prueba después de lavada la semilla se dejó en Hipoclorito de Calcio [Ca (OCl)₂] al 4 % durante 15 minutos, posteriormente se pasaron en agua oxigenada (H₂O₂), durante 24 hrs. en agitación a 50 RPM (Revoluciones Por Minuto), antes de ser cultivadas.

Segunda prueba (B).

En esta prueba, después de lavada la semilla, se le agrego fungicida (BRAVO 720) al 2% en agua estéril, dejándose durante 24 hrs., en agitación a 50 RPM, antes de ser colocadas en las cajas petri.

Tercer prueba (C)

Para esta prueba después de lavadas las semillas, se dejaron en agua oxigenada (H₂O₂) en su concentración comercial, durante 48 hrs, en agitación a 50 RPM, antes de ser disectadas y cultivadas.

Cuarta prueba (D).

Esta se realizó a 5 plantas de *Pseudotsuga* proporcionadas por el Colegio de Postgraduados, se les aplicó AGRIMYCU 500 ® (fungicida-bactericida), quince días antes de obtener los explantes (yemas, ápices, y tallos), mismos que se lavaron con detergente al chorro del agua, después se pasaron a una solución de alcohol al 70 % durante 15 minutos, se enjuagaron en agua con antioxidante (Ác. Ascórbico más Ác. Cítrico), para controlar el necrosamiento, posteriormente se pasaron a una solución de cloro comercial al 6 % durante 5 minutos, enjuagándose con agua más antioxidante, los explantes permanecieron en esta agua hasta el momento de ser cultivados *in vitro*.

4.4. Pruebas de germinación.

4.4.1. Prueba en cámaras de germinación.

En esta prueba se utilizaron las semillas, tratadas con fungicida (B), las cuales se colocaron en cajas petri, con papel filtro húmedo; tres cajas se colocaron en

una cámara de germinación con una temperatura de 20 °C y otras dos cajas se pusieron en otra cámara de germinación con una temperatura de 30 °C, en ambas cámaras con 16 hr día y 8 hr de oscuridad, cada caja contenía 10 semillas, estas se regaron cada segundo día, con agua esterilizada durante dos meses.

4.4.2. Prueba en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

En esta se utilizaron las semillas que pasaron por la prueba de desinfestación con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ y H_2O_2 (A), cultivadas en medio nutritivo MS (1962) al 100 %.

También se utilizaron las semillas que pasaron por H_2O_2 (C), estas se disectaron y se les extrajo el embrión, los que fueron cultivados en el mismo medio (ver cuadro 1 del anexo).

4.5. Medio de cultivo

4.5.1. Medio para germinación *in vitro* de semillas y embriones

El medio básico utilizado en las pruebas de germinación de semillas fue MS (1962) al 100 %, sin reguladores de crecimiento, con vitaminas (Tiamina, $40.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Myo-inositol ($100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Sacarosa (Azúcar) al 3 %, agar $8 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 , se vació 10.0 mL de medio en cada tubo ensaye.

4.5.2. Medio para inducir la formación de callos

El medio básico utilizado fue MS (1962), dividido en dos tratamientos; en el primero (E1), se disminuyeron los nitratos al 50 % y se aumentaron los fosfatos

al 200% de las soluciones madre, se le adicionaron vitaminas(Tiamina, 40.0 mg·L⁻¹), Myo- inositol (100.0 mg·L⁻¹), L- Glutamina (450.0 mg·L⁻¹), Caseina hidrolizada (100.0 mg·L⁻¹), 8 g·L⁻¹ de agar, 3 % de sacarosa(azúcar), y de reguladores de crecimiento: 3.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg·L⁻¹ de BA, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 .

El segundo tratamiento (E2), las sales básicas del medio MS(1962) no se modificaron, y se adiciono: 8.0 g·L⁻¹ de agar, 3 % de sacarosa(azúcar), Myo- inositol (100.0 mg·L⁻¹), L- Glutamina (450.0 mg·L⁻¹), 1.5 % de maltosa, más 2.0 mg·L⁻¹ de ANA, 0.5mg·L⁻¹ de BA, 0.5 mg·L⁻¹ de KIN y 1.0 mg·L⁻¹ de ABA se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 . Se vaciaron 10.0 mL de ambos medios por tubo de ensaye.

4.5.3. Medio para proliferación de callos.

El medio básico utilizado fue el de MS (1962) al 100 %, adicionado con 0.1 % de carbón activado, con el fin de controlar la oxidación, 8.0 g·L⁻¹ de agar, sacarosa (azúcar) al 3 %, Myo- inositol (100.0 mg·L⁻¹), vitamina (Tiamina, 40 mg·L⁻¹), más 1.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D, 0.9 mg·L⁻¹ de BA y 0.8 mg·L⁻¹ KIN, se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 , se vaciaron 10.0 mL del medio en cada tubo.

4.5.4. Medio para inducir el crecimiento de callos.

Se utilizó como medio básico el medio de HS (1972) (ver cuadro 2 de Anexo), adicionado con Tiamina·HCL (5.0 mg·L⁻¹), Ác. Nicotínico (5.0 mg·L⁻¹), Piridoxina.HCL (5.0 mg·L⁻¹), Myo-inositol (100.0 mg·L⁻¹), carbón activado al

0.1%, sacarosa (azúcar) al 3 %, 8.0 g·L⁻¹ más 0.0, 0.5, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ de BA y 0.0, 0.5, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ de KIN, se ajustó a un pH de 5.7± 0.1, se vaciaron 15.0 mL del medio en cada tubo de ensaye.

4.5.5. Medio para inducir la formación de embriones

Se utilizó como medio básico el de HS (1972), adicionado con Tiamina.HCL (5.0 mg·L⁻¹), Ác. Nicotínico (5.0 mg·L⁻¹), Piridoxina.HCL (5.0 mg·L⁻¹), Myo-inositol (100 mg·L⁻¹), carbón activado al 0.1 %, sacarosa (azúcar) al 3 %, 8.0 g·L⁻¹ de agar, más 0.0 y 0.5 mg·L⁻¹, de BA, 0.0 y 0.5 m·L⁻¹ Kinetina y 0.0, 10.0, 20.0 y 40.0 mg·L⁻¹ de ABA, se ajustó a un pH de 5.7± 0.1, se vació 15.0 mL del medio por tubo de ensaye.

4.5.6. Medio para inducir la Organogénesis

Se utilizó como medio básico el de MS(1962) al 100 %, con vitaminas (Timina, 40 mg·L⁻¹), carbón activado (50-100 mg·L⁻¹), maltosa al 1.5 %, Myo-inositol al 2%, L-glutamina 450 mg·L⁻¹, más 0.3 mg·L⁻¹ de ANA, 0.5 mg·L⁻¹ de BA, 0.5 mg·L⁻¹ de KIN, 8.0 g·L⁻¹ de agar y sacarosa (azúcar) al 3 %, se ajusto aun pH de 5.7 ±0.1, se vació 10.0 mL por tubo de ensaye.

4.5.7. Medio para desarrollo de plántulas.

Se utilizaron las sales básicas de MS(1962) al 100 %, sin reguladores de crecimiento, para promover la germinación de los embriones, después de dos semanas se subcultivaron en el medio MS(1962) al 100 %, adicionado con vitaminas WS (Aguilar y Lozoya, 1997), carbón activado al 0.1 %, 8 g·L⁻¹ de

agar, Myo-inositol ($100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), al primer tratamiento se le adicionó azúcar al 3 y 6%, y al segundo se le adicionó sacarosa al 3 y 6 %, como fuente de carbohidratos. Se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 , se vació 15 mL por tubo de ensaye.

Nota: Para todos los medios se utilizaron tubos de ensaye de 55 mL y 25 X 150 mm, con tapas de 25 mm de diámetro, esterilizados en gradillas, por 25 minutos en autoclave a una temperatura de 121°C y 1.2 kg/cm^2 de presión, solidificaron a temperatura ambiente.

4.6. Cultivo.

El cultivo de todos los explantes, se realizó bajo condiciones asépticas, dentro de la cámara de aire laminar filtrado de flujo horizontal, con ayuda de pinzas para disección, cajas de petri de cristal, un mechero, alcohol al 70 y 96 %, agua esterilizada con antioxidantes, mango de bisturí con navajas del No. 11 y 24, cubre boca y cofia.

Los cultivos fueron los siguientes:

- **Cultivo de semillas sin disectar**

Después de desinfestar (A) las semillas, se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada y se mantuvieron en una caja de petri con agua más antioxidantes, las semillas se cultivaron con el micrópilo en contacto con el medio en forma vertical.

- **Aislamiento y cultivo de embriones**

Posterior a la desinfestación (C), las semillas se disectaron bajo el microscopio, para extraer los embriones, estos se mantuvieron en una caja de petri con agua más antioxidantes, se cultivaron con aguja para jeringa de 3mL 21Gx32mm (0.80 mm)(1 ¼"), con los cotiledones hacia arriba, y el eje hipocótilo-radícula en contacto con el medio, en forma vertical. Los embriones destinados para la formación de plántulas, se cultivaron de la misma forma.

- **Cultivo de ápices, yemas, tallos con una y dos hojas**

Los explantes disectados de las plantas fueron: yemas, ápices, y segmentos de tallo con fragmentos de una (Forma I) y dos hojas (Forma II) de 1 cm de longitud, después de desinfestados (D), se enjuagaron con agua con antioxidantes cinco veces, y se cultivaron en forma vertical.

- **Subcultivo de callos**

Los callos antes de ser subcultivados se pasaron en agua con antioxidante.

4.7. Incubación

Las semillas, embriones, callos, ápices, yemas, tallos y plántulas se mantuvieron en el cuarto de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos, bajo condiciones controladas, con una temperatura promedio máxima de 27 °C ± 1°C durante el día y una mínima de 22 a 24 °C durante la noche, con un

fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; la iluminación de los niveles del estante, fue proporcionada por lámparas fluorescentes DURO-TEST (Labline ®.Mexico de 75 W).

Los tubos con semillas, embriones y callos estuvieron en el primer nivel del bajo una intensidad luminosa de $17 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (micromoles de fotones), mientras que las plántulas estuvieron en el tercer nivel bajo una intensidad luminosa de $29 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para la primer prueba se colocaron tubos con semillas y embriones dentro de la incubadora Lab-Line IMPERIAL®, bajo condiciones de oscuridad, y con una temperatura constante de 25 °C.

4.8. Aclimatación de las plántulas fuera del medio de cultivo

Las plántulas desarrolladas en el medio adicionado con vitaminas WS, más azúcar y sacarosa al 3 y 6 %, se pasaron a la fase de aclimatación para observar su sobrevivencia fuera del medio. El sustrato utilizado fue una mezcla de Peat-moss, Agrolita y Vermiculita en una proporción de 52, 23 y 25 %, a esta mezcla se le agregó 40 mg de MycorTree™ Ecto-Inyectable™ (cepas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma*), y para el control de la presencia de enfermedades en la radícula, las plántulas se sumergieron en una solución de 20 mL con 25 mg de T-22™ PHC™ (Fungicida Biológico para raíz y follaje; I.A. *Trichoderma harzianum*, Cepa T-22) (KRL-AG2). Estas se trasplantaron en tubetes, los cuales estuvieron protegidos dentro de una bolsa durante 15 días, para mantener la humedad relativa, misma que se fue disminuyendo gradualmente con pequeñas aberturas en la bolsa, hasta que las plántulas

soportaron la humedad del ambiente, y una exposición luminosa de $61 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con una temperatura máxima de 29 °C y una mínima de 21 °C.

Una semana después se fertilizaron con la solución de sales inorgánicas del medio MS (1962) diluidas al 50 %. En esta prueba se observó la aclimatación de las plántulas y formación de hojas.

4.9. Evaluación de las pruebas de desinfestación y germinación

La evaluación de las diferentes pruebas fue la siguiente:

- **Evaluación en cámaras de germinación**

Para la prueba de germinación de semillas en las cámaras, las variables a evaluar fueron porcentaje de contaminación y número de semillas germinadas, el tiempo de observación fue de 2 meses.

- **Evaluación de la germinación de semillas *in vitro***

Para los tubos con semillas, las variables a evaluar fueron porcentaje de contaminación y germinación, bajo luz y oscuridad, el periodo de cultivo fue de siete días.

- **Evaluación de la germinación de embriones en medio MS (1962) sin reguladores**

En esta prueba se evaluó el número de embriones que se contaminaron y los que respondieron al medio, las observaciones fueron a los 3,4 y 13 días.

4.10. Evaluación de la formación y crecimiento de callos

- **Evaluación del medio para inducir la formación de callos (E1 y E2)**

Los embriones cuya respuesta fue favorable en la germinación, se utilizaron para establecer esta prueba. Las variables a evaluar fueron: embriones que formaron callo y porcentaje de necrosamiento, en 20 días después de cultivados.

- **Evaluación de crecimiento de callos**

Los callos obtenidos con anterioridad se utilizaron en esta prueba. Las variables a evaluar fueron crecimiento y tiempo de oxidación, en un período de 20 días, después de cultivados.

4.11. Evaluación de yemas, ápices y tallos con una y dos hojas

Con el fin de inducir la organogénesis, por medio de diferentes explantes las variables a evaluar fueron: contaminación, necrosamiento y respuesta al medio de cultivo, en 5, 12, 19, y 26 días después de cultivados.

4.12. Evaluación de los callos en el medio HS (1972) con BA y KIN

En esta etapa se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar, la unidad experimental fue un callo por tubo, los datos se presentan a los 9 y 17 días; el diseño consta de 2 bloques; 4 tratamientos y 7 repeticiones (ver cuadro 4), la variable respuesta fue el diámetro por callo.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el paquete Statistical Analysis System (SAS, 1999), con una confiabilidad del 95%, lo que implica un $\alpha=0.05$.

Cuadro 4. Tratamientos

Tratamiento	Medio: HS	
	BA (mg·L ⁻¹)	KIN (mg·L ⁻¹)
T1	0.0	0.0
T2	1.0	1.0
T3	0.5	0.5
T4	3.0	3.0

4.12.1. Modelo estadístico

Para el análisis de los datos se considero un diseño en bloques completos al azar, cuyo modelo esta definido como:

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

$$i = 1, 2, 3, \dots, b \quad j = 1, 2, \dots, t$$

Y_{ij} =Respuesta obtenida en el i-ésimo bloque del j-ésimo tratamiento

b = Número de bloques.

t = Número de tratamientos.

μ =Medio general.

β_i =Efecto del j-ésimo bloque.

τ_j =Efecto del j-ésimo tratamiento.

e_{ij} =Error aleatorio.

$$\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$$

4.13. Evaluación de la recuperación de callos en medio HS (1972) con BA y KIN

Para los callos que estuvieron en la prueba anterior, se intentó su recuperación en el tratamiento con carbón activado al 0.1 % y 0.5 mg·L⁻¹ de BA y KIN, se dejó como tratamiento el anterior, del que provenían; Para evaluar este efecto se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con diferente número de repeticiones, en el que se empleó como unidad experimental un callo. El período de cultivo fue de 4 semanas.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el paquete SAS (1999), con una confiabilidad del 95%.

4.13.1 Modelo estadístico.

El modelo estadístico para el análisis de los datos está definido por:

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

$$i = 1, 2, 3, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, r.$$

t = Número de tratamientos.

r_i = Número de repeticiones para el i-ésimo tratamiento.

Y_{ij} = Respuesta obtenida en la j-ésima repetición con el i-ésimo tratamiento.

μ = Medio general.

τ_j = Efecto atribuido al i-ésimo tratamiento.

e_{ij} = Error aleatorio.

$$\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$$

4.14. Evaluación de formación de embriones en medio HS (1972) con ABA

Para evaluar esta etapa se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar, en el que se empleó como unidad experimental un callo por tubo, los datos se presentan a la primera, segunda; tercera y cuarta semana, el diseño consta de 4 bloques y 4 tratamientos, los cuales se muestran en el cuadro 5, las variables a evaluar fueron formaciones globulares (embriones).

El análisis estadístico se realizó en el paquete SAS (1999), con una confiabilidad del 95%.

Para determinar la mejor combinación de reguladores de crecimiento, se usó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5 %.

Para el modelo experimental se consideraron los siguientes tratamientos:

Cuadro 5. Tratamientos

Tratamiento	Medio: HS (1972)		
	BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	KIN ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ABA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
T1	0.5	0.5	0.0
T2	0.5	0.5	10.0
T3	0.5	0.5	20.0
T4	0.5	0.5	40.0

El modelo estadístico empleado fue el mismo que se utilizó en el subtema 4.12.1.

4.15. Evaluación del crecimiento de callos en medio HS (1972) con ABA

Para evaluar el diámetro de los callos se utilizó un diseño completamente al azar, en el que se empleó como unidad experimental un callo, el diseño consta de 4 tratamientos (ver cuadro 5), el período de cultivo fue de 4 semanas.

El análisis estadístico se realizó en el paquete SAS (1999), con una confiabilidad del 95%.

El modelo estadístico fue similar al planteado en el subtema 4.13.1:

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

4.16. Evaluación del desarrollo y aclimatación de las plántulas dentro y fuera del medio MS (1962).

- **Evaluación del desarrollo de las plántulas**

Para las pruebas con azúcar y sacarosa con concentraciones al 3 y 6 %, se evaluaron el número de hojas, altura y necrosamiento por plántula, los conteos se hicieron en un período de 56 días, divididos en 6 semanas.

- **Evaluación de la aclimatación de las plántulas**

Las plántulas que se trasplantaron para adaptación fuera del tubo de ensaye, se observaron durante 29 días de los cuales estuvieron dentro de la bolsa 15 días, en esta prueba se observó, la aclimatación y la formación de hojas.

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1. Descripción de la semilla

El lote de semilla, que se utilizó tuvo un peso total de 10.37047 gr., con una longitud promedio de 5 mm $\pm$ 0.56 mm. Se encontró aproximadamente un 40 % de semilla vana y un 10 % de semilla dañada por insectos.

Se realizaron cortes de la semilla, para tener una descripción general de las partes que la conforman.

La semilla presenta (ver figura 5) : Micrópilo, Suspensor, Megagametofito femenino, Embrión, Tegumento interno, Cubierta seminal; Partes del embrión: Meristemo apical (Plúmula), Cotiledones (4-7), Eje Hipocótilo-Radícula y Suspensor. En la preparación se logro observar la presencia de almidón, taninos y lípidos.

5.2. Respuesta a la prueba de desinfestación y germinación

Las semillas que pasaron por la prueba de desinfestación con fungicida (BRAVO 720) (B), y colocadas en las cámaras de germinación en 20 y 30° C, no presentaron contaminación durante los dos meses de observación, durante este periodo las semillas únicamente se hincharon en ambos tratamientos sin germinar. De acuerdo con Mápula (2004), el contenido de humedad de estas semillas no fue el adecuado y los embriones no estaban aun maduros, aunando las temperaturas de las cámaras que no favorecieron la germinación, y como menciona Acevedo (1998), *Pseudotsuga* se desarrolla en temperaturas de 14 a 24° C.

Mientras que las semillas que pasaron por la prueba de desinfestación con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ y H_2O_2 (A), y cultivadas en medio MS (1962) al 100 %, sin reguladores de crecimiento bajo dos condiciones (luz y oscuridad) (ver figura 6). Se observó que a partir del cuarto día, aparecieron bacterias, contaminando todos los tubos en ambas condiciones.

5.3. Respuesta de la germinación con embriones en medio MS (1962).

Las semillas que pasaron por la prueba de desinfestación con H_2O_2 (C), que se les extrajo el embrión, cultivados en medio MS (1962), la contaminación (por bacterias) fue de 27.77 % (ver figura 5 y cuadro 4) en los primeros 3 días, la respuesta al medio fue de 44.44 % a los 13 días y el 27.77 % no respondió. La contaminación en esta prueba fue gradual, aunque este procedimiento se utilizó en las siguientes pruebas, y no se presentaron problemas por contaminantes, y al contrario de lo que menciona Monjarás *et al.*, (2000), en su proceso de desinfestación, utilizó bactericidas y fungicidas, en nuestros resultados usar agua oxigenada en su concentración comercial, fue eficiente.

Sin embargo, la respuesta que tuvieron los embriones al medio de cultivo, no fue positiva al 100 %, y una posible razón es que los embriones que germinaron eran maduros, cuya etapa de dormancia se rompió al adquirir los nutrientes que necesitaba del medio, al contrario de los que no respondieron; otra razón puede ser que los embriones no fueron dañados al disectar la semilla. López (2000) menciona que con embriones maduros de *Picea chihuahuana* M, y Monjarás *et al.*, (2000), al utilizar embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* F, se forman brotes adventicios, cuando se cultivan en medios con

reguladores de crecimiento. Sin embargo, el medio MS (1962) sin reguladores sirvió para promover una germinación más rápida en los embriones (ver figura 4 y cuadro 6).



Figura 4. Gráfica de germinación de embriones de *Pseudotsuga* spp

Cuadro 6. Porcentaje de germinación de los embriones a los 3,4 y 13 días †.

	3	7	13
Respuesta (resp)	0	38.88	44.44
Contaminación (Conta)	16.66	11.11	27.77
Sin respuesta (S-resp)	55.55	33.33	27.77

†: Observaciones después de la fecha de cultivo (11/06/2004)

5.4. Respuesta al medio para inducir la formación de callos.

Los embriones que fueron subcultivados en medio MS (1962) en los dos tratamientos (E1 y E2), bajo condiciones de luz y oscuridad, se observó que en el tratamiento donde los nitratos se disminuyeron (E1) y en condiciones de luz, los embriones respondieron formando callos a los 20 días (ver figura 6); y bajo condiciones de oscuridad no hubo respuesta. Sin embargo, Tang (2001) menciona que en *Pinus taeda* L., tardan 9 semanas en formar callos usando el

mismo medio, mientras que en el tratamiento con malta (E2), en condiciones de luz y oscuridad, no respondieron y comenzaron a necrosarse a los 8 días después de subcultivados, lo anterior se debe a la edad del embrión y a la actividad de los reguladores en el medio, como menciona Skoog y Miller (1986), que las proporciones entre auxinas y citocininas no fueron las adecuadas y suprimieron la respuesta. En ambos tratamientos y condiciones no hubo presencia de contaminación. Los embriones que estuvieron en condiciones de oscuridad, les faltó luz para responder y de acuerdo con Murashige (1986) y Latkowska (2000), la luz tiene gran influencia en el crecimiento del tejido embrionario, aunque también el crecimiento depende del genotipo.

5.5. Respuesta al medio de proliferación de callos.

Los callos obtenidos, fueron subcultivados en el medio para proliferación, donde se pudo sentir que tenían una consistencia friable y suave, en esta prueba los callos no crecieron, únicamente mantuvieron su color verde durante 14 días, necrosándose totalmente a los 19 días, y de acuerdo con Conger, (1984) al señalar que una concentración no adecuada de carbón activado en el medio, puede inhibir la embriogénesis.

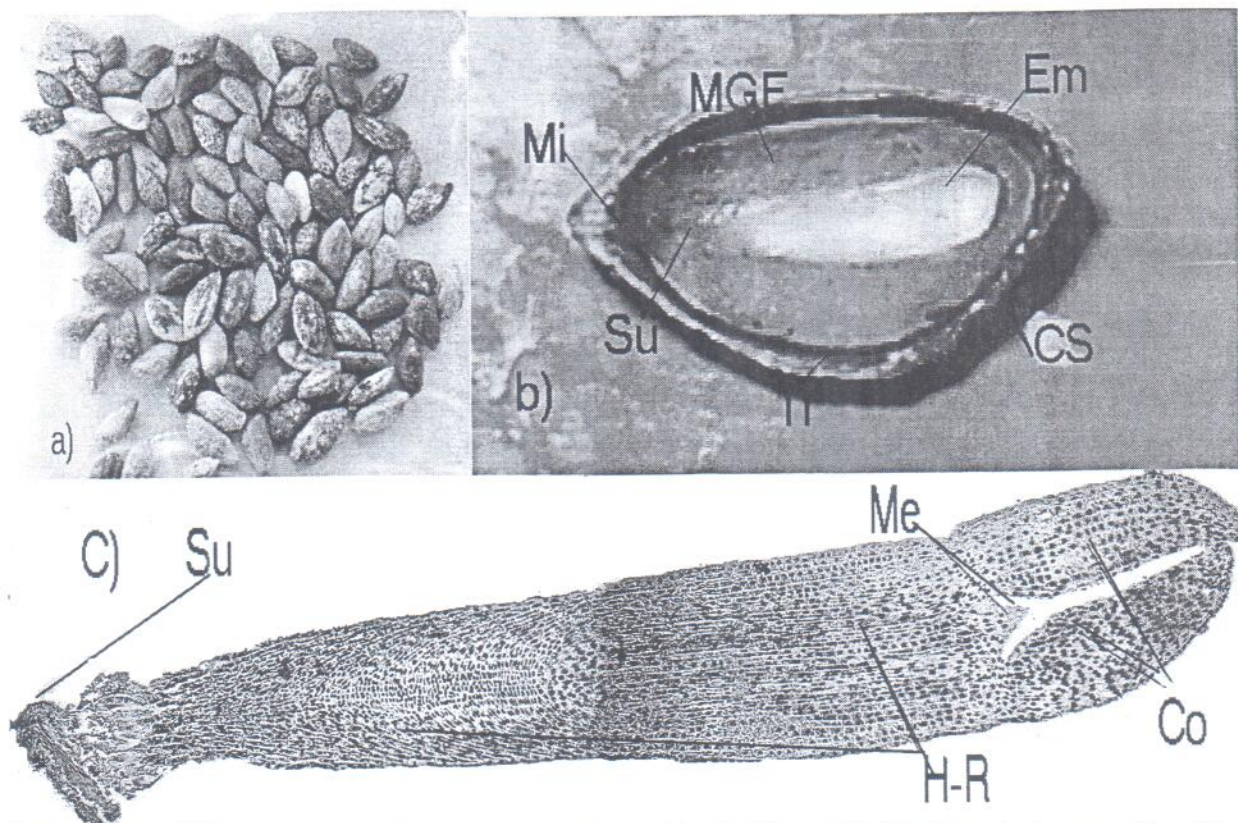


Figura 5. a) Semilla de *Pseudotsuga macrolepis* Flous; b) Partes de la semilla: Mi, Micrópilo; Su, Suspensor; MGF, Megagametofito femenino; Em, Embrión; Ti, Tegumento interno; CS, Cubierta seminal; c) Partes del embrión: Me, Meristemo apical (Plúmula); Co, Cotiledones (4-7); H-R, Eje Hipocótilo-Radícula; Su, Suspensor (Unión de dos fotografías).

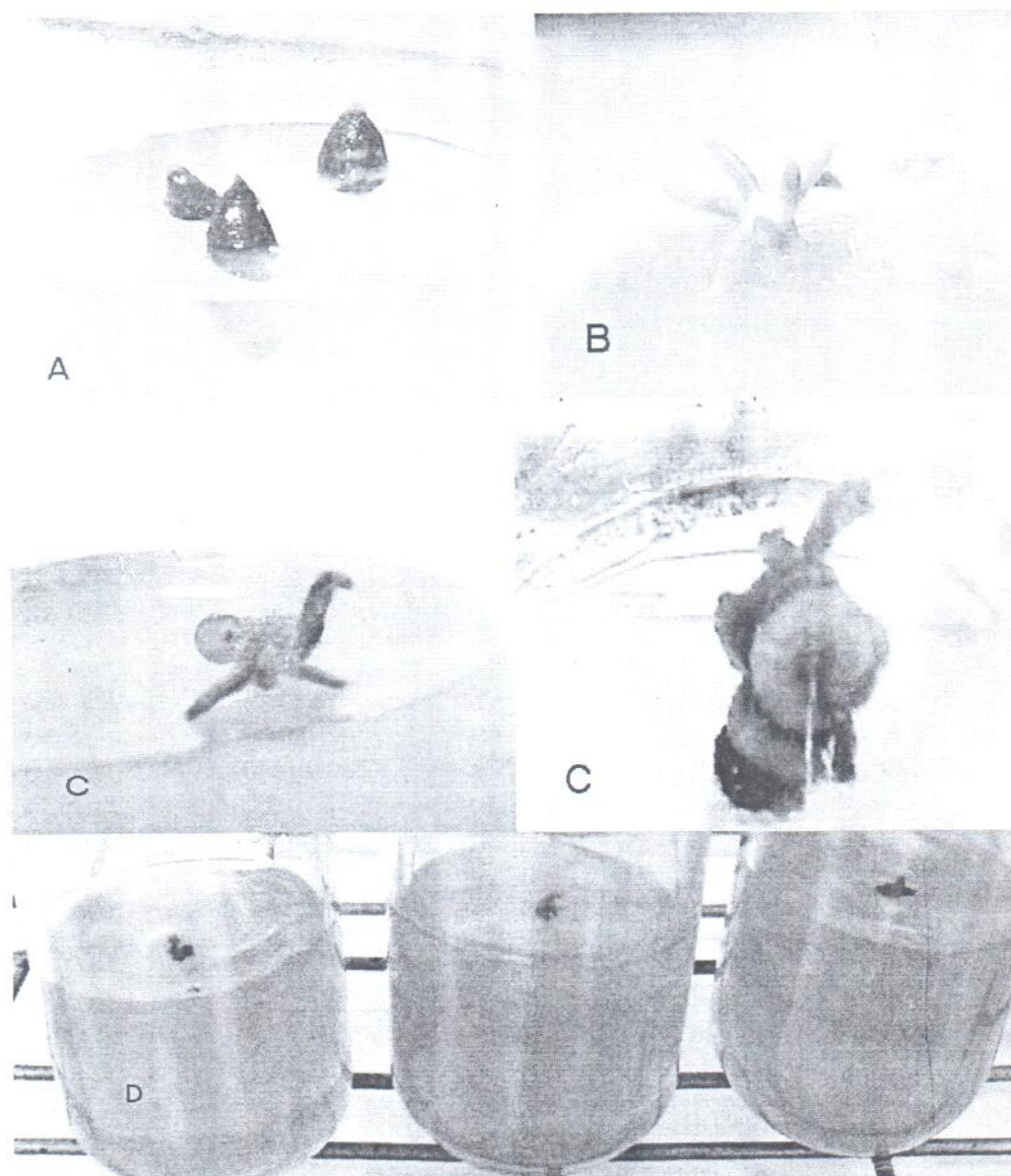


Figura 6. A, Semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. en medio MS (1962); B, Embrión en medio MS (1962) sin reguladores a los 13 días; c, C, Formación de callos en el tratamiento donde se disminuyó la concentración de nitratos (E1) a los 2 días; D, Embriones en el tratamiento con malta (E2) a los 8 días.

5.6. Respuesta de las yemas, ápices y tallos

En esta prueba los explantes no respondieron al medio de cultivo, el necrosamiento se presentó a los 5 días después de ser cultivados, en tallos con dos hojas (Forma II) y en ápices; mientras que en tallos con una hoja (forma I) y yemas, comenzó a los 12 días después de cultivados, resultando un total de 56.53 % de necrosamiento de todos los explantes a los 26 días (ver figura 7 y 9) y una contaminación total de 43.47 %, por la presencia de hongos.

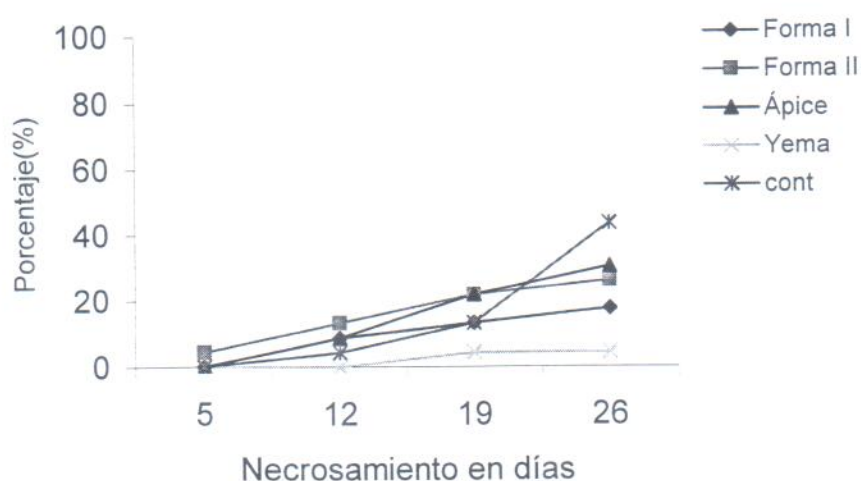


Figura 7. Gráfica del porcentaje de necrosamiento de explantes de plantas de *Pseudotsuga macrolepis* F.

La contaminación se debió a que el proceso de desinfestación no fue el adecuado o el tiempo de aplicación del fungicida-bactericida no fue suficiente, para evitar la presencia de hongos. Sin embargo el necrosamiento en los explantes se presentó de forma rápida, y la concentración de sales no fue la adecuada en el medio de cultivo, de acuerdo a lo reportado por McCown, (1980), donde menciona que el necrosamiento se da por una inadecuada

concentración de sales y bajos niveles de nitratos, de los que se encuentran en el medio MS (1962).

5.7. Respuesta de los callos al medio de crecimiento HS (1972) con BA y KIN

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza obtenidos el valor de $Pr > F = 0.1528$, se encontró que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de BA y KIN, en el incremento del diámetro de los callos.

No obstante, se observó que el necrosamiento en el tratamiento con concentraciones de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA y KIN, se presentó a los 17 días (ver figura 8). Tang (2001) menciona que en *Pinus taeda* L, el crecimiento de la masa embriogénica llegó a 17 % en medio básico MS (1962) al 50 % con 2,4-D y BA; mientras que Salajova (1996), reportó en híbridos de *Abies alba* Mill x *Abies cephalonica* Lend. y de *Abies alba* Mill x *Abies numidica* De Lann, cultivados en medio SH con $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP, que fue más eficiente para la formación y crecimiento de callos.

Los callos crecidos fueron limitados por la actividad del 2,4-D, aunado al necrosamiento.

5.8. Respuesta a la recuperación por necrosamiento

Para recuperar los callos subcultivados en el tratamiento con carbón activado al 0.1 % y $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA y KIN.

En base al análisis de varianza se encontró que el valor de $Pr > F = 0.0289$, indica que un grupo de callos se recuperó del necrosamiento y aumentaron su

diámetro (ver figura 9), de acuerdo con Fleycher, (1985) menciona que adicionar carbón activado al medio se absorben los fenoles y se retarda el necrosamiento.

5.9. Respuesta de la formación de embriones en medio HS (1972) con ABA.

En base al análisis de varianza se encontró que el valor de $Pr>F = <.0001$, por lo que un tratamiento tuvo efecto sobre la formación de embriones en los callos.

Para conocer cual de estos tratamientos, tuvo mejor efecto en la formación de embriones, se utilizó la prueba de TUKEY con un nivel de significancia del 5 %, con la cual se obtuvieron los resultados del cuadro 7.

Cuadro 7. Agrupación de los tratamientos por la prueba de TUKEY.

Tratamiento	Grupo	Media	N
1	A	2.2500	16
2	B*	0.950675	16
3	B	0.2500	16
4 (Testigo)	C	0.0000	16

* Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas y son estadísticamente iguales.

En base al cuadro 7 se encontró que el mejor tratamiento para la formación de embriones fue con una concentración de $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ABA (ver figura 9).

Monjarás *et. al* (2000), reportó que los embriones maduros de *Pseudotsuga.macrolepis* F, cultivados en medio SH (1972) con ANA /BA ó 2,4-D/KIN inducen la formación de protuberancias nodulares y la formación de embriones entre la cuarta y sexta semana; Sin embargo, Tang (2001),

menciona que en callos de *Pinus taeda* L., subcultivados en medio con auxinas y citocininas a una concentración de 1/5, durante 9 semanas, se formaron masas embriogénicas y al ser subcultivadas en medio líquido con ABA, glicol polietileno y carbón activado, formaron embriones somáticos; sin embargo, Bonga (2004), reportó que la edad de los explantes, tiene gran influencia en la embriogénesis somática, estudios realizados con *Larix decidua* de 42 años en medio AFC se formaron estructuras embrionarias, durante el verano, en nuestro caso el tiempo no fue el suficiente para el desarrollo completo de las estructuras embriogénicas.

5.10. Respuesta de los callos en medio HS (1972) con ABA.

La evaluación del diámetro final en base a al análisis de varianza se encontró que el valor de $(Pr>F)= 0.1781$, nos indica que estadísticamente no existen diferencias entre tratamientos, con respecto al diámetro de los callos.

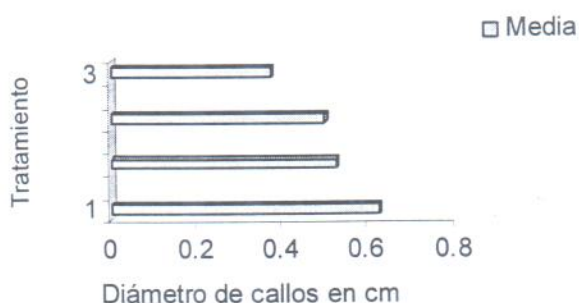


Figura 8. Promedio del diámetro de callos de *Pseudotsuga macrolepis* F.

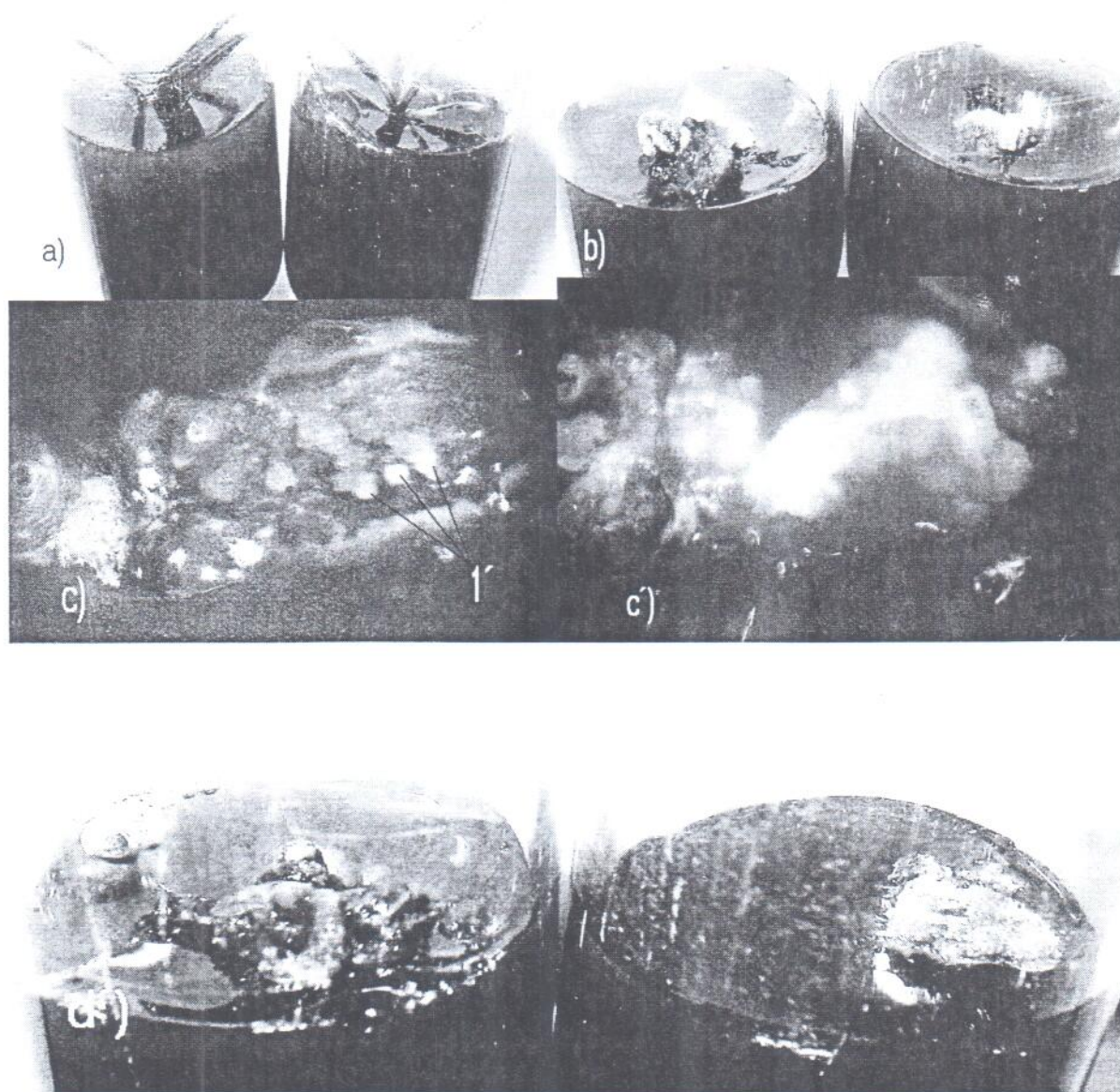


Figura 9. a), Necrosamiento en ápices de *Pseudotsuga macrolepis* F., a los 26 días; b), Callos en medio HS (1972) con 0.5 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y KIN a los 17 días; c), c'), Formación de estructuras embriogénicas en medio HS (1972) con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN, BA y $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABA en la cuarta semana; d'), Recuperación de callos en medio HS(1972) con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y KIN a los 17 días.

5.11. Respuesta al medio MS (1962) en la formación de plántulas

5.11.1. Respuesta al medio adicionado con azúcar

- Medio con vitaminas WS y azúcar al 6%

Los embriones formaron 3 plántulas, con hojas bien diferenciadas, sin embargo las plántulas se necrosaron a partir de los 21 días, sin formar raíz. (Ver cuadro 8 y figura 10)

Cuadro 8. Número de hojas por plántula.

Cultivo:08/11/2004 Observación (días)	Hojas		
	p1	p2	p3
7	4	5	4
14	5	3	1
21	2	0	0
28	2	0	0
37	1	0	0
56	0	0	0

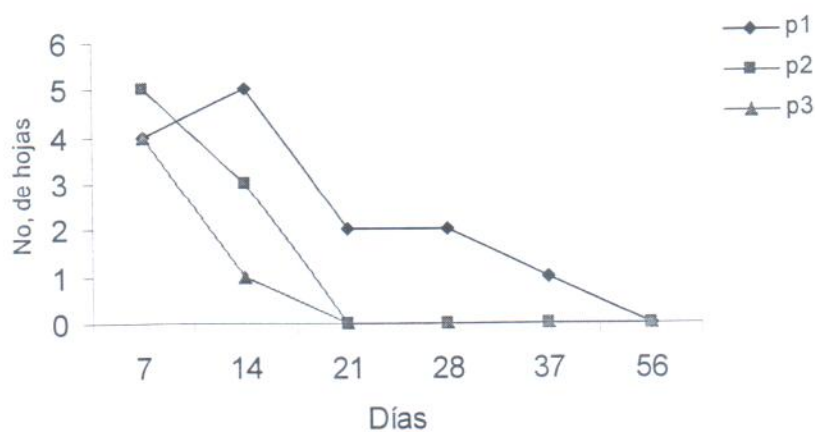


Figura 10. Número de hojas por plántula de *Pseudotsuga macrolepis* F.

- Medio con vitaminas WS y azúcar al 3%

Los embriones formaron 3 plántulas, necrosándose una a los 10 días (ver cuadro 9 y figura 11). Se observó que la plántula con más altura fue de 2.6 cm (P1) a los 56 días y con una radícula de 1.4 cm 2.6 cm (ver cuadro 10 y figura 12).

Cuadro 9. Número de hojas por plántula.

Cultivo:08/11/2004 Observación (días)	Hojas		
	P1	P2	P3
7	9	5	4
14	13	10	4
21	18	12	5
28	23	14	3
37	27	15	1
56	28	17	0

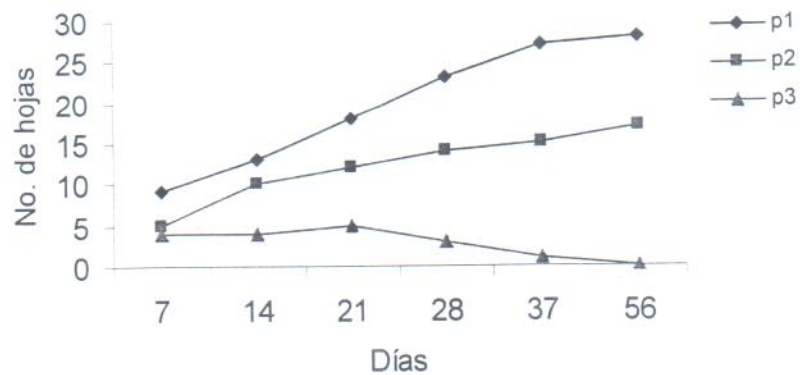


Figura 11. Número de hojas por plántula de *Pseudotsuga macrolepis* F.

Cuadro 10. Altura de las plántulas.

Cultivo:08/11/2004 Fecha de observación	Altura (cm)		
	P1	P2	P3
7	0.7	0.3	0.5
14	0.9	0.5	0.5
21	1.1	0.5	0.6
28	1.7	0.9	0.8
37	2.4	1	1
56	2.6	1.4	1.4

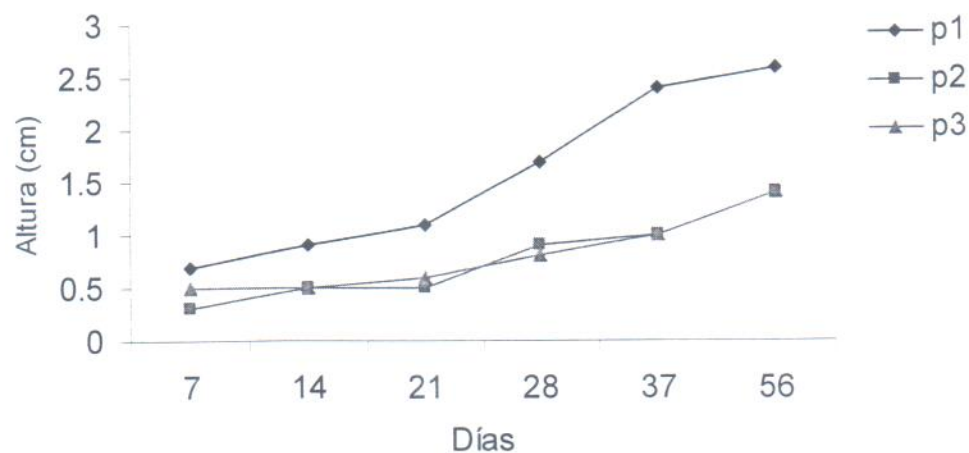


Figura 12. Altura por plántula de *Pseudotsuga macrolepis* F..

5.11.2. Respuesta al medio adicionado con sacarosa

- **Medio con vitaminas WS y sacarosa al 6%**

Los embriones formaron 3 plántulas, el necrosamiento se presentó en una plántula a los 14 días (ver cuadro 11 y figura 13). La altura máxima de una plántula fue de 2.3 cm (P2), con una radícula de 1.8 cm (ver cuadro 12 y figura 14).

Cuadro 11. Número de hojas por plántula.

Cultivo:18/11/2004		Hojas verdes		
Fecha de observación	p1	p2	p3	
7	4	4	3	
14	2	6	6	
21	2	8	7	
27	1	12	9	
46	0	18	11	
56	0	20	13	

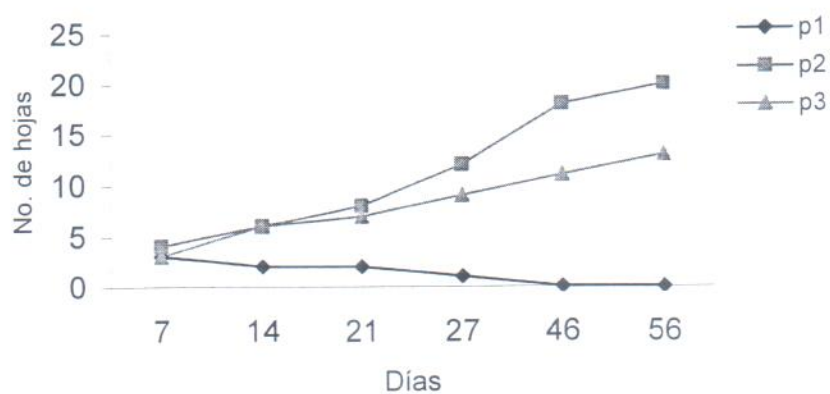


Figura 13. Número de hojas por plántula de *Pseudotsuga macrolepis* F.

Cuadro 12. Altura de las plántulas.

Cultivo:18/11/2004		Altura de la plántula (cm)		
Fecha de observación	P1	P2	P3	
7	0.4	0.6	0.3	
14	0.6	0.9	0.5	
21	0.6	1.6	0.6	
27	0.6	1.8	0.6	
46	0.6	2	0.8	
56	0.6	2.3	1	

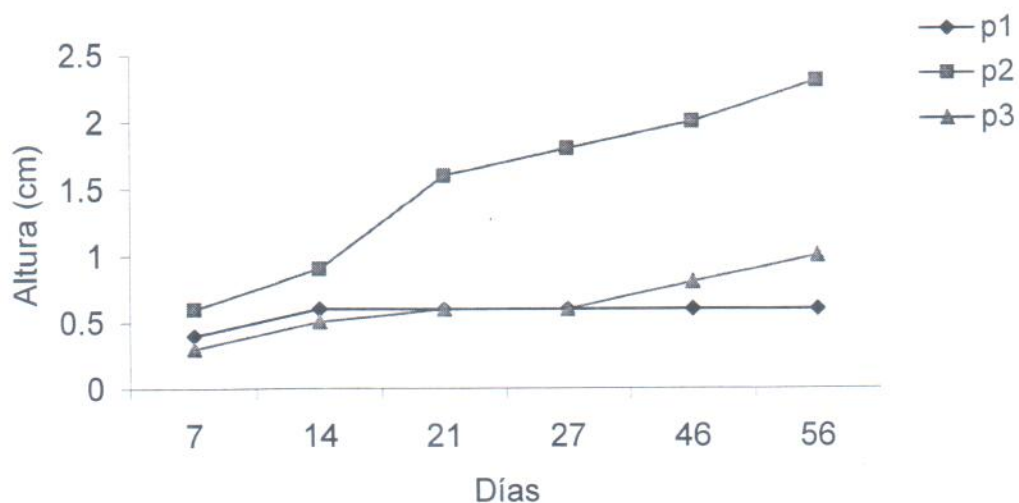


Figura 14. Altura de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* F.

- **Medio con vitaminas WS y sacarosa al 3%**

Los embriones formaron 2 plántulas, el necrosamiento se presentó en una plántula (p2) a partir de los 14 (ver cuadro 13 y figura 15). La altura máxima de una plántula fue de 1.7 cm (p1), con una longitud de raíz de 1 cm (ver cuadro 14 y figura 16).

Cuadro 13. Número de hojas por plántula.

Cultivo:18/11/2004		Hojas	
Observación (días)	p1	p2	
7	5	4	
14	7	4	
21	10	2	
27	15	1	
46	19	0	
56	25	0	

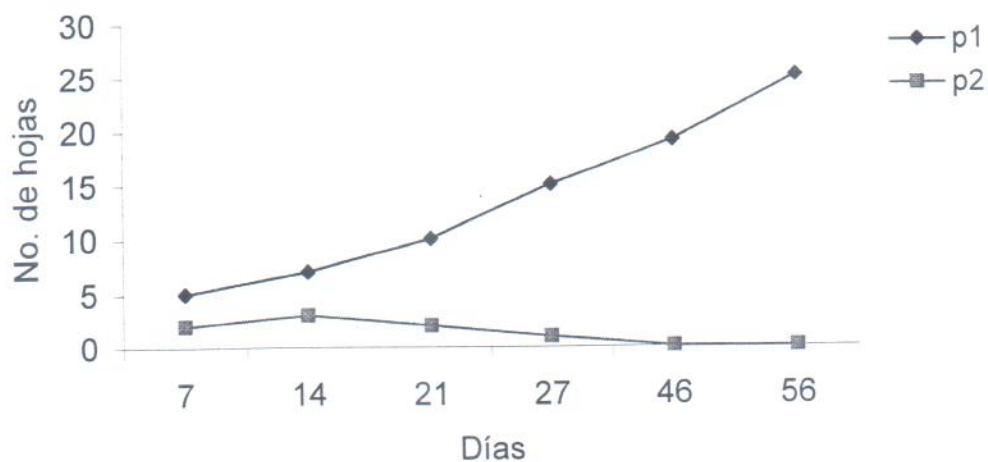


Figura 15. Número de hojas por plántula de *Pseudotsuga macrolepis* F.

Cuadro 14. Altura de las plántulas

Cultivo:18/11/2004		Altura (cm)	
Observación (días)		P1	P2
7		0.4	0.5
14		0.7	0.5
21		1.3	0.7
27		1.3	0.7
46		1.5	0.9
56		1.7	0.9



Figura 16. Altura de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis*. F.

5.11.3. Discusión del desarrollo de las plántulas en el medio MS (1962) con azúcar y sacarosa.

El medio con azúcar al 3 % desarrolló plántulas con tallos largos, delgados, y con más hojas, mientras que el medio con sacarosa al 6 % desarrolló plántulas con tallos cortos, gruesos y con pocas hojas; sin embargo, la altura en una de las plántulas fue de 2.3 cm, expuesta a una intensidad de luz de $29 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Monjaras *et al* (2001) menciona que los brotes de *Pseudotsuga macrolepis*, elongan sus hojas y tallos, alcanzando de 1.5 a 2 cm de altura, en un medio al 50 % de su concentración, sin reguladores de crecimiento y con sacarosa al 0.3 %; y con una intensidad de luz de $30 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; lo que indica que una concentración adecuada de sacarosa (fuente de carbono) y las condiciones de incubación influyen en el desarrollo de tallos y hojas.

Las plántulas obtenidas no desarrollaron una raíz larga en el medio de cultivo, de acuerdo con Ahuja (1996), menciona que al inducir la formación de raíz en brotes de *Sequoia sempervirens* D.Don, fue mínima y se dio en un medio libre de hormonas y en un medio con una concentración de BAP y las plántulas en sustrato de turba con perlita, forman un 20 % de raíces. Mientras que Bousselmame, (2001), menciona que en plántulas de *Argania spinosa* L, subcultivadas en medio MS (1962) al 50 % con IBA y ANA, en concentraciones iguales, y en condiciones de oscuridad, se puede inducir la formación de raíz en un 85% (ver figura 17).

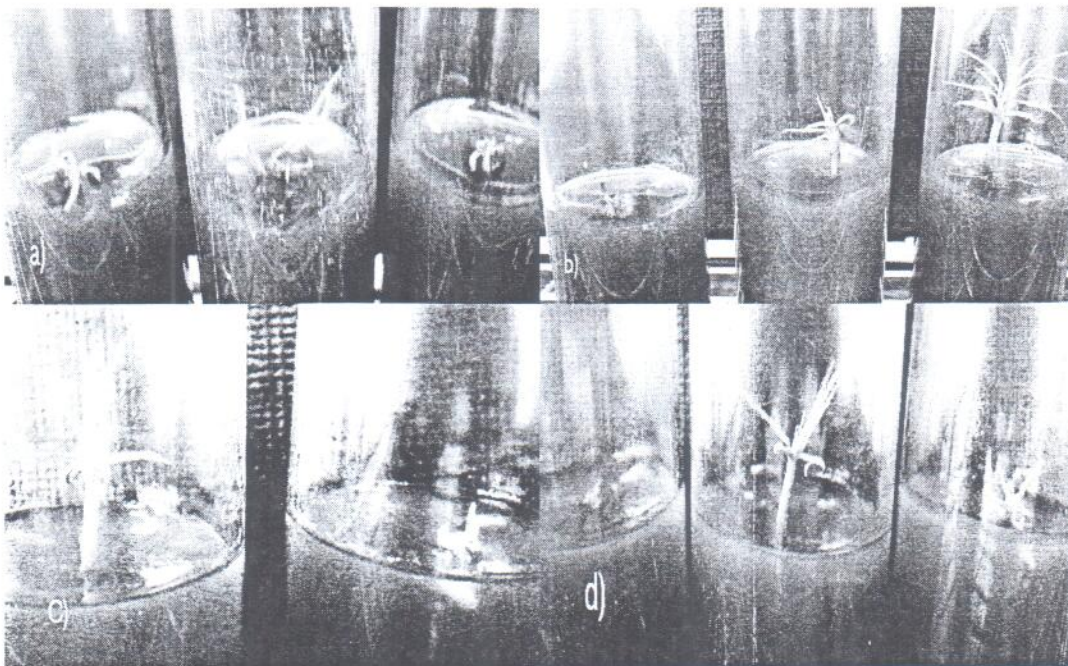


Figura 17. a), Plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* F., en medio con azúcar al 6 % a los 21 días; b), Plántulas en medio con azúcar al 3 % a los 28 días; c) Plántulas en medio con sacarosa al 3 % a los 21 días; d) Plántulas en medio con sacarosa al 6 % a los 21 días.

5.12. Respuesta de la aclimatación de las plántulas fuera del medio.

De las 4 plántulas que se pasaron al sustrato, tres de ellas se secaron a los 25 días, sobreviviendo una plántula proveniente del medio con sacarosa al 6 %, sin embargo presenta un crecimiento muy lento (ver figura 18).

(Donald, 2000), menciona que las raíces micorrizadas tienen mayor capacidad para absorber nutrientes del suelo y la multiramificación y el crecimiento de las hifas dentro del suelo incrementan la absorción de agua y nutrientes, especialmente fósforo y por consecuencia las plantas se vuelven más tolerantes a la sequía, a altas temperaturas del suelo y a ciertas toxinas.

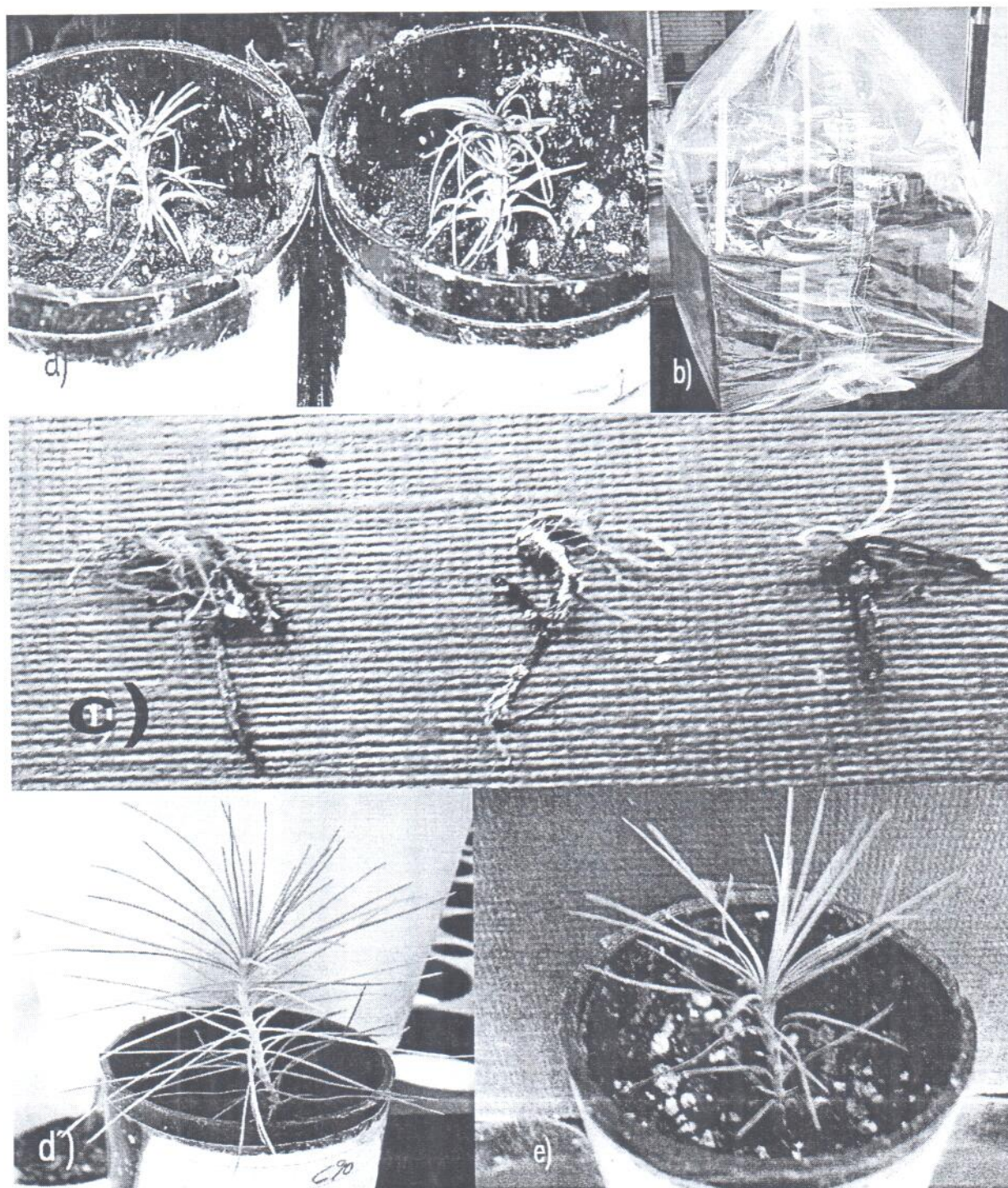


Figura 18. a), Trasplante de las plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* F., al sustrato; b), Aclimatación de las plántulas; c), Plántulas muertas a los 25 días; d) y e), Plántula aclimatada a los 29 días.

6. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas de desinfestación se concluye que el mejor método, siempre que se extraigan los embriones de las semillas, es lavar con detergente y dejarlas en agua oxigenada en su concentración comercial, durante 48 hr, en agitación.
- La mejor prueba de germinación, fue cultivar los embriones en medio básico MS (1962) al 100 %, sin reguladores de crecimiento.
- El medio de cultivo que promovió la morfogénesis a partir de embriones, formando callos, fue el medio MS (1962) modificando los nitratos, los fosfatos, y adicionando coadyuvantes como L- Glutamina y caseína hidrolizada, mas reguladores de crecimiento (E1).
- La mejor respuesta para la formación de estructuras embriogénicas, fue en el medio HS con 10.0 mg.L^{-1} de ABA; sin embargo el desarrollo es lento y requiere de tratamientos constante de antioxidantes para evitar el necrosamiento.
- No hubo respuesta en la inducción de la organogénesis a partir de hojas y tallos, por contaminantes y necrosamiento.

- De acuerdo con los resultados obtenidos el mejor tratamiento para desarrollar plántulas, fue en medio MS (1962) con vitaminas WS y azúcar al 3 % y para desarrollar plántulas más resistentes para ser aclimatadas fue en medio MS (1962) con vitaminas WS y sacarosa al 6 %.
- Agregar hongos micorrizicos al sustrato permitió la formación de raíz y sobrevivencia de una plántula.

7. RECOMENDACIONES

En estudios de este tipo es recomendable extender el tiempo de experimentación, dado que las respuestas de los explantes son lentas.

Así también al inducir la formación de callos; después de desinfestar las semillas y extraer el embrión, es recomendable cultivarlos directamente en medio nutritivo MS (1962) al 100 %, sin reguladores, para inducir la germinación de los embriones y subcultivarlos en medio MS (1962) modificando los nitratos y fosfatos (E1).

En la formación de estructuras embriogénicas a partir de callos, se recomienda realizar pruebas en medios MS (1962) y HS (1972), con bajas concentraciones de ABA, dando baños constantes a los callos de agua con antioxidantes, durante el periodo de cultivo, el cual debe ser mayor de 4 semanas por su lento crecimiento.

En la inducción de la organogénesis a partir de explantes de plantas completas, es recomendable extender el tiempo de aplicación de fungicidas, antes de disectar y cultivar los explantes, así también disminuir los niveles de nitratos, utilizar otro inhibidor de la oxidación diferente al carbón activado en el medio de cultivo, y dar un baño constante de agua con antioxidantes a los explantes durante el tiempo de cultivo.

Para inducir el desarrollo más rápido de plántulas con brotes, es recomendable realizar pruebas en medio MS (1962) con vitaminas, azúcar y Kinetina.

Así como promover la formación de raíces desde el medio de cultivo y darle las condiciones adecuadas de temperatura a las plántulas en aclimatación, y observar más a fondo el desarrollo de la raíz, inducido por micorrizas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo R. R. 2004. Variación geográfica y efecto de la fertilización en la fenología vegetativa y crecimiento de plántulas de *Pseudotsuga* sp. Tesis de Maestro en Ciencias. Instituto de Recursos Naturales Programa Forestal. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 76 pp.
- Acevedo R. R. 1998. Estudio ginecológico del bosque *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco var. *oaxacana* Debreczy & Rácz en la zona de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. Tesis Profesional. UACH-DiCiFo. Chapingo. México. 105 pp.
- Aguilar D. N. 1997. Efecto de citocininas en organogénesis y desarrollo de vainilla (*Vainilla planifolia* A.) *in vitro*. Tesis Profesional, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. 40 pp.
- Agúndez D., *et al.* 1999. Genetic identification of comercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. *In*: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed). 22-25 September, Victoria-Gasteiz, Spain. 552-654 p.
- Ahuja M. 1996. Micropropagation and field testing of frost-tolerant *Sequoia Sempervirens*.-Genotypes
<http://cnr.berkeley.edu/~jleblanc/WWW/Redwood/rdwdMicropro.html#Heading3>
42
- Arya S.; Kalia R.K ; Arya-ID. 2000. Induction of somatic embriogenesis in *Pinus roxburghii* Sar. Plant-CELL-REPORTS. 19(8):775-780 <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&issm...>

Blakesley D, N Pask, GG Henshaw & MF Fay, 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: *in vitro* strategies and cryopreservation. Plant Growth Reg. 20: 11-16 p.

Becwar M. R. *et al.* 1988. Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. Somatic cell genetics of woody plants ed M.R. Ahuja, 1-18 p, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Berjak, P. *et al.* Strategies for *in vitro* conservation of hydrated germplasm. *In vitro* conservation of plant growth genetic resources. ed M.N. Normah, IPGRI <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&issm...>

Bonga J.M. 2004. The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix deciduas*. http://doc.cist.nrc-cnrc.gc.ca/openurl_int_e?

Bousselmame F. 2001. Optimizing cultural conditions for *in vitro* rooting of Argan (*Argania spinosa* L.). Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, laboratoire de biotechnologie et de physiologie végétale, BP 121, Ait Melloul, Agadir, Maroc Département de biologie, faculté des sciences, université Mohammed-V, BP 1014, Rabat, Maroc bousselmame@iavcha.ac.ma

Conger B.V. 1984. Cloning Agriculture Plants via *in vitro*. Techniques Department of plant and soil science University of Tennessee Knoxville, Tennessee. Boca Raton, Florida. 273 pp.

CONABIO. 2002. El sistema nacional de áreas naturales protegidas. Por Erika Domínguez Cervantes. CONABIO: <http://www.conabio.org.mx>.

Dayton Wilde, H., Meagher, R.B. & Merkle, S.A. 1992. Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. Plant Physiology 98: 1-120. de Lange, W.J. *et al.*, 1993. RAPD-fingerprinting to identify *Eucalyptus grandis* clones. South African Forestry Journal 167: 47-50 p.

Debergh P.C. and R.H Zimmerman. 1993. Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. P.O.Box 17,3300. AA Dordrecht, The Netherland. 484 p.

Diario Oficial de la Federación.1994. Poder Ejecutivo, Secretaría de Desarrollo Social. Tomo CDLXXXVIII N° 10 Primera sección. México, D.F. 23 p.

Domínguez, A. 1983. Una nueva localidad para *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales: Ciencias Forestales. 8(45):3-6 p.

Dominguez A. 1994. Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México. INIFAP-CIR Golfo Centro Folleto Técnico N° 23. México.43 pp.

Donald H. 2000. Una asociación entre raíces finas y hongos benéficos http://www.phcmexico.com.mx/phcnogal_esp.html

FAO. 1994. International Code of Conduct on Plant Biotechnology as it affects the Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources. Revised version of CPGR/93/9 Annex. <http://www.fao.com>

Farjon A. 1990. Pinaceae: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedros*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothosuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books. Konigstein, Federal Republic of Germany: 177-191 p.

Finer, J.J., Kriebel, H. & Becwar, M.R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Plant Cell Reports 8: 203-206 p.

Find J.I. *et al.*, 1993. Cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis* and subsequent plant regeneration. *Scandinavian Journal of Forestry Research* 8: 156-162 p.

Figueroa S. B. 1998. Causas estructurales de los incendios forestales. *In*: SEMARNAP. Foro Nacional sobre "Los Incendios Forestales en el Contexto del Desarrollo Rural". Consejo Técnico Consultivo Nacional Forestal: 21-32 p.

Grout B. 1995. Cryopreservation of excised meristems, shoot tips and somatic embryos. *Genetic preservation of plant cells in vitro*. ed B. Grout, pp. 47-61 p. Springer-Verlag, Berlin.

<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&issm...>

Guerra de la C. V. 2001. Stand structure and dynamics of isolated *Pseudotsuga* forests in Southern North America. PhD. Thesis. Northern Arizona University. 92 pp. <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&issm...>

Gupta PK & GS Pullman, 1991. Method for producing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. U.S. Patent.No.5,036,007. <http://web5.silverplatter.com>

Gupta PK & J Grob, 1995. Somatic embryogenesis in conifers. *In*: Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol 1, 81-98. S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. <http://web5.silverplatter.com>

Jain SM, PK Gupta and RJ Newton (eds.) 1999. Somatic embryogenesis in woody plants, Volume 4-5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (in press). E- mail. jain@helsinkiFi

Jain SM and K. Ishii.1998. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. *In*: Recent Advances in Biotechnology for Tress Conservation and manage-ment. SH Mantell, S Burns, C. Tragardh (eds.). International Foundation for Science, Stockholm Sweden (in press). E-mail. jain@helsinkiFi

Kartha K.K. 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 276 pp.

Latkoska-MJ; Kvaalen-H; Appelgren-M. 2000. Genotype depend blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. http://doc.cisti-icist.nrc-cnrc.gc.ca/openuri_int_e?

Leszek S. J. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Vol. I. Propiedades y acción. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Instituto de Horticultura. ed. Mundi-Prensa. México. España. 487pp.

Li P. and W.T. Adams.1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesi*). Can.J. For.Res. 19:149-161p.

Little E. Jr. 1979. Checklist of United States Tree. Agricultural Handbook. No. 541. USDA Forest Service. 375 pp.

Lloyd G. and McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 30: 421-27. http://doc.cisti-icist.nrc-cnrc.gc.ca/openuri_int_e?

López E. A, Olguín S. P, Márquez J, Chávez V. M y R. Bye. (2000). Adventitious bud formation from Mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez an Endangered Mexican Spruce Tree. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Distrito Federal, México and Facultad de Ciencias, (UNAM), México, D.F. <http://www.idealibrary.com>

Mápula L.M. 2004. Indicadores reproductivos para poblaciones naturales de *Pseudotsuga* Carr. en México. Tesis de Maestro en Ciencias. Instituto de Recursos Naturales Programa Forestal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx.46 pp.

Mápula M. 1995. Pruebas de germinación y evaluación del crecimiento inicial de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, en Chapingo, México. Tesis Profesional de Ing. Forestal. División de Ciencias Forestales. Chapingo, Méx. 91pp.

Martínez M. 1963. Las Panaceas Mexicanas. 3ª ed. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 401 pp.

Mirov N.T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press Co. NY. 14-15 p.

Minero A. 1999. Aspectos prácticos de la aplicación de hongos y microorganismos benéficos. Productores de Hortalizas, 8:18-21 p.

Monjarás G. *et al.* 2001. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous., a partir del cultivo de embriones maduros. Cartel. Conservación y Manejo de Recursos. Universidad Autónoma de Tlaxcala. 10 pp.

Mc Donald J. A. 1993. Phytogeography and history of the alpine-sualpine flora of northeastern Mexico. *In*: Ramamoorthy T.P., R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Press. New York. :681-703 p.

McCown D. D, B. H McCown. 1987. North American hardwoods. *In*: Bonga JM, Durzan DJ (Eds) CELL AND Tissue in Forestry, Vol 3 : 247-260 p.
<http://web5.silverplatter.com>

Mc Cown B.H. 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. *In*: Davis TM. Hassing Be & Sankhla N. Adventitious Formation in Cuttings. Portland. USA: pp 289-302 pp. <http://web5.silverplatter.com>

McKellar D. S., Herman, B. and Watt, M.P. 1994. Towards a protocol for the micropropagation of *Pinus patula* Scheide *et* Deppe. South African Forestry Journal 171: 33-42 p.

Mousseler A.; J.E. Major; Simsom J.D; Daigle B and K Longe. 2000. Indicators of population viability in red spruce *Picea rubens* L. Reproductive traits and fecundity .Con.J.Bod. 78:298-940 p.

Murashige T., and R Nakano. 1986. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells, Amer J Bot 54:963-979.

Murashige T & F Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Niembro R.A. 1986. Mecanismo de Reproducción sexual en Pinos. Ed. LIMUSA, Chapingo, México. 130 pp.

Owston P.W. and W.I. Stein. 1974. *Pseudotsuga* Carr. Douglas-fir. In: Seeds of woody plants in the United States. C.S. Schopmeyer (ed) Agriculture Handbook 450.U.S.D.A., Forest Service. Washington, D.C.: 674-638 pp.

Pierik, R.L.M., 1990, Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, Mundi Prensa, Madrid.

PHC. 2004. Plant Health Care de México. <http://www.phcmexico.com.mx>

Pullman-GS, Namjoshi-K; and Zhang-Y. 2003 a. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L) improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. Inst Paper Sci & Technol, Atlanta, GA 30318 USA. PLANT-CELL-22 (2): 85-95 p. <http://web5.silverplatter.com>

Reyes H .2002. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga*. Tesis de Maestro en Ciencias. Instituto de Recursos Naturales Programa Forestal. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. Méx.46 pp.

Rzedowski G. y J. Rzedowski. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 432pp.

Salajova T. 1996. Embryogenic culture and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica* and *Abies alba* x *Abies numidica*). <http://web5.silverplatter.com>

Sánchez O. 2000. Micropropagación de especies leñosas nativas. Ed. Trama. Universidad de Concepción, Chile. 322 pp.

Saccheri I.M. *et al.* 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*. 392; 491-494 p.

Schenk R.U and Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledons and dicotyledons plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204 p. <http://web5.silverplatter.com>

SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA. 1999.

SEMARNAT. 2000. Red mexicana de germoplasma forestal. *Gaceta* 4 enero-marzo, 39-53 p.

SEMARNAT/CONAFOR. 2001. Programa Nacional Forestal. <http://www.conafor.org.mx>

SEMARNAT. 2001. LA PRODUCCION DE ÁRBOLES MÉXICO, Documento de Información al público. 10 p. <http://www.conafor.org.mx>

Silveira V. 2003. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryonic suspension cultures of *Pinus taeda*. http://www.doc.cisti-icist.nrc-cnrc.gc.ca/openurl_int_e?

Strauss S.H. and A.H. Doersen.1990. Evolutionary relationships of Douglas-fir and its relatives (Genus *Pseudotsuga*) from DNA restriction fragment analysis. Can.J.Bot. 68:1502-1510. <http://web5.silverplatter.com>

Summer H.E, Brown CL and P. P. Korman. 1975. Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro, Bot Gaz 135: 270-200 p.

Tang W.; Guo-ZC and Ouyang-F. 2001a. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. N Carolina State Univ; Dept Forestry; Raleigh; NC 27695;USA. IN VITRO-CELLULAR-AND-DEVELOPMENTAL-BIOLOGY-PLANT; 37(5): 558-563 pp. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Tang W. 2001b. *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Talavera, A.I. y M. R Aguilera, 2001. Fortalecimiento de bancos de germoplasma forestal de la SEMARNAP 1998-2000. Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal, 6. Diciembre 2000-Febrero2001: 71-76 p. SEMARNAT. México D.F.

Teulieres, C., Leborgne, N. & Boudet, A.M. 1993. Direct gene transfer procedures for *Eucalyptus* genetic transformation. *In Vitro Cellular and development Biology* 28: 121A. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Valdés A. E. 2001. Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons Unidad de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, c/ Catedrático Rodrigo Uría, s/n. 33071 Oviedo, Asturias, Spain Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved. May 2001, Pages 377-384, vol.39, ISSUE 5 http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Varela H. S. 1998. Los recursos forestales de México. *In* SEMARNAP. Memorias del Ciclo de Conferencias "El Sector Forestal de México, Avances y perspectivas", Dirección General Forestal, Subsecretaría de Recursos naturales. 29-43 p.

Vander B. R. W. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding – A review. *Euphytica* 56: 269-285 pp
http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Von Arnold S, U Egertsdotter, I Ekberg, P Gupta, H. Mo & J Nørgaard, 1995. Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). *In*: Somatic embryogenesis in woody plants, Vol. 3, 17-36. SM Jain, PK Gupta & RJ Newton (eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Vargas H. J. 2003. Estado de la diversidad biológica de los y bosques en el Norte de México. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales. Documento de Trabajo FGR/47S. Dirección de Recursos Forestales FAO, Roma, Italia. Departamento de Montes. <http://www.fao.org/forestry/index.jsp>

Watt, M.P. *et al*, 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South African Forestry Journal* 157: 60-66 pp. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Watt M. P. *et al.*, 1995. Field performance of micropropagated and macropropagated *Eucalyptus* hybrids. *South African Forestry Journal* 173: 17-21. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Watt M.P., F.C Blakeway, R Termignoni and S.M Jain. 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. *In*: Somatic embryogenesis in woody plants, S.M.Jain. P.K. Gupta & R.J. Newton (eds.), Volume 5. Kluwer

Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. http://doc.cisti-icist.nrc.gc.ca/-openurl_itnt_e?

Watt M.P. et al., 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. South African Forestry Journal 157: 60-66 p. <http://web5.silverplatter.com>

ANEXO.

Cuadro 1. Medio de Murashige y Skoog (MS, 1962)

Fórmula de sales inorgánicas	
Nombre del compuesto	Concentración original mg/L
Nitratos	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
Sulfatos	
Mg SO ₄ -7H ₂ O	370
Mn SO ₄ -H ₂ O	16.9
Zn SO ₄ -7H ₂ O	8.6
Cu SO ₄ -5H ₂ O	0.025
Halogenos	
Ca Cl ₂ -2H ₂ O	440
KI	0.83
Co Cl ₂ - 6H ₂ O	0.025
Fosfatos	
PO ₄ ;BO ₃ ;Mo O ₄	
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ Mo O ₄ - 2H ₂ O	0.25
Solución de Fierro	
Na Fe - EDTA	
Na ₂ EDTA -2H ₂ O	41.23
Fe SO ₄ - 7H ₂ O	27.8

Cuadro 2. Medio de Schenk y Hildebrandt (HS, 1972).

Compuestos	Formula de sales	Concentración original mg·L ⁻¹
Nitratos		
KNO ₃		2,500
NH ₄ H ₂ PO ₄		300
Sulfatos		
MgSO ₄ •7H ₂ O		400
MnSO ₄ •H ₂ O		10
ZnSO ₄ •7H ₂ O		1
CuSO ₄ •5H ₂ O		0.2
Halogenos		
CaCl ₂ •2H ₂ O		200
KI		1
CoCl ₂ •6H ₂ O		0.1
Fosfatos		
H ₃ BO ₃		5
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O		0.1
Solución de Fierro		
Na ₂ EDTA		15
FeSO ₄ •7H ₂ O		20
Vitaminas		
Tiamina•HCL		5
Nicotinamida(niacin)		5
Piridoxina•HCL		0.5
Suplementos		
myo-inositol		1000
Sacarosa		30,000

Cudro 3. Composición de las vitaminas WS. (Aguilar, 1997)

Compuestos	Cantidad para 100 mL de solución madre
Tiamina	10 mg
Pantotenato de Calcio	10 mg
Myo-Inositol	100 mg
Piridoxina HCL	10 mg
Ác. Nicotínico	50 mg
Rivoflavina	5 mg
Ác. Fólico	1 mg
Biotina	0.1 mg
Ác. Para-aminobenzioco	5 mg

Cuadro 4. Análisis de varianza para inducir el crecimiento de callos

Fuentes de variación	de	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr> F
Modelo		4	0.12928571	0.03232143	2.00	0.1093
Error		51	0.82625000	0.01620098		
Total corregido		55	0.95553571			
Fuentes de variación	de	GL	Suma de cuadrados Tipo I	Cuadrados medios	Valor de F	Pr> F
BLOQ		1	0.04017857	0.04017857	2.48	0.1215
Trat		3	0.0810714	0.02970238	1.83	0.1528

R ²	CV
0.135302	27.73483

Cuadro 5. Análisis de Varianza para la recuperación de callos.

Fuentes de variación	de	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr> F
Modelo		3	0.45500000	0.15166667	3.48	0.0289
Error		28	1.22000000	0.04357143		
Total corregido		31	1.67500000			

R ²	CV
0.271642	38.83492

Cuadro 7. Análisis de varianza para el número de estructuras embrionarias formadas.

Fuentes de variación	de	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr> F
Modelo		6	52.2187500	8.7031250	9.63	<.0001
Error		57	51.5156250	0.9037829		
Total corregido		63	103.7343750			
R ²		CV				
0.503389		110.6240				

Cuadro 8. Tabla de Análisis varianza para la variable diámetro final de los callos.

Fuentes de variación	de	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr> F
Modelo		3	0.126875500	0.04229167	1.93	0.1781
Error		12	0.26250000	0.02187500		
Total corregido		15	0.38937500			
R ²		C V				
0.325843		29.21521				