



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ÁRIDAS

EVALUACIÓN DE RESPUESTAS ORGANOGÉNICAS *IN VITRO* DE
NOGAL PECANERO [*Carya illinoensis* (WANGENH) K. KOCH]

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO

AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
COORDINACIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA

MARCO ALBERTO CONTRERAS PINTO



Bermejillo, Durango.

Junio 2015

El presente trabajo de tesis titulado: “EVALUACIÓN DE RESPUESTAS ORGANOGÉNICAS *IN VITRO* DE NOGAL PECANERO [*Carya illinoensis* (WANGENH) K. KOCH]” fue dirigido por el Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila, asesorado por el Dr. Sigifredo Armendáriz Erives y el Dr. Ricardo Trejo Calzada. Ha sido aprobado y revisado por el Comité Asesor como requisito parcial para obtener el grado de:

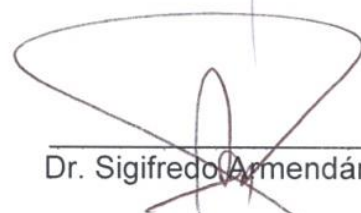
**Maestro en Ciencias en Recursos Naturales
y Medio Ambiente en Zonas Áridas**

Director:



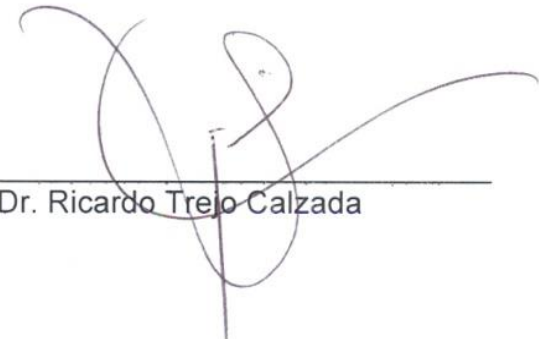
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

Asesor:



Dr. Sigifredo Armendáriz Erives

Asesor:



Dr. Ricardo Trejo Calzada

AGRADECIMENTOS

Se expresan Agradecimientos a las instituciones, organismos y personas que durante la formación académica fueron fundamentales para el desarrollo y conclusión de mis estudios de maestría.

Al Programa de becas nacionales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico recibido durante los estudios de maestría 2013-2014.

A los integrantes académicos y administrativos del Programa de Maestría en Ciencias en Medio Ambiente y Recursos Naturales en Zonas Áridas, por sus conocimientos, dedicación y atención.

A mi Madre, por ser la persona que siempre me ha alentado, amado y ser la más feliz de verme concluir esta etapa.

A mi tío Francisco, por ser el padre que es y por la alegría que le causa que alcance mis metas.

A mis hermanos, por confiar siempre en mí y apoyarme incondicionalmente toda la vida.

A mi esposa, por ser mi soporte y aliada en estos años de matrimonio, por demostrarme que con su compañía podemos lograr nuestras metas y superar expectativas.

A mis hijos Dafne y Jozef, que han sido la luz en mi vida y son el principal motivo para confiar y trabajar en el reajuste de este mundo.

A mi comité asesor, el Dr. Jesús Arreola, Dr. Sigifredo Armendáriz y Dr. Ricardo Trejo, por su tiempo, paciencia, conocimientos y consejos.

A mis compañero de generación, Jesús, José de Jesús, Mariela, Elizabeth y Janeth, por su amistad, compañerismo y las lecciones que aprendí de ellos con su simple compañía.

A Margarita Ávila Ramírez por su paciencia, tiempo, alegrías, regaños y atenciones que fueron fundamentales durante mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por impregnar en el institucionalismo y amor por esta casa de estudios.

A la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, por inspirar mis días y permitir llenarlos de experiencia, crecimiento profesional y alegrías.

DATOS BIOGRÁFICOS

El C. Marco Alberto Contreras Pinto, es originario de Ciudad Lerdo Durango, realizó sus estudios de Bachillerato en el Centro de Bachilleratos Tecnológicos, Industriales y de Servicios No. 4, donde concluyó el programa de Técnico Laboratorista Clínico, en el año 2007, es Ingeniero en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Gómez Palacio generación 2009-2012.

Durante sus estudios de Ingeniería participo en proyectos de carácter ambiental en dos dependencias gubernamentales, en el rastro municipal de la ciudad de Gómez Palacio Durango para gestionar la elaboración de una planta tratadora de aguas residuales y para gestionar el tratamiento de los residuos sólidos orgánicos, en la Dirección municipal de medio Ambiente y Ecología de Ciudad Lerdo Durango, en proyectos para gestionar apoyos para un manejo adecuado y disposición de los Residuos Sólidos Urbanos producidos por comunidad rurales del municipio de Lerdo Durango.

Su línea de investigación actual se relaciona con la biotecnología vegetal, específicamente el cultivo de tejidos vegetales, con el Proyecto: Evaluación de respuestas organogénicas *in vitro* de nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], por medio del cual logró terminar la presente tesis bajo la supervisión directa del Dr. Jesús Arreola Ávila.

El C. Marco Contreras, ha impartido conferencias y talleres en la Universidad Politécnica de Gómez Palacio, el Instituto Tecnológico de la Laguna, el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Lerdo y la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo, además de formar parte de la coordinación del Programa de Formación de Nuevos Investigadores en la URUZA-UACH.

Evaluación de respuestas organogénicas *in vitro* de nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch].

Contreras Pinto Marco Alberto¹, Arreola-Ávila Jesús².

RESUMEN

El nogal pecanero se propaga por semilla ya que es una planta difícil de multiplicarse vegetativamente. En este estudio explantes de yemas de esta especie provenientes de árboles jóvenes y adultos fueron cultivadas *in vitro*. Se obtuvieron respuestas organogénicas positivas y negativas. Las respuestas positivas se lograron en explantes de segmentos nodales procedentes de árboles juveniles, mientras que en los explantes provenientes de árboles adultos no se logró obtener diferenciación de tejido. Se utilizaron los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) de sales inorgánicas al 100% y Woody plant médium adicionados con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL⁻¹, Myo-inositol 100 mgL⁻¹, 60 mgL⁻¹ de L- Cisteina y 3% de sacarosa. Se observó un 25% de explantes oxidados que procedían de árboles juveniles, comparado con un 36.67% de explantes con la misma característica tomados de árboles adultos. Se incrementó el número de hojas y la elongación de los brotes mediante la adición de 1 mgL⁻¹ y 3 mgL⁻¹ de kinetina (KIN), 3 mgL⁻¹ y 1 mgL⁻¹ de 2 isopentenil adenina (2ip) y 0.3 mgL⁻¹ ácido indolbutírico (AIB).

Palabras clave: organogénesis, medio de cultivo, explantes de yema, arboles jóvenes, arboles adultos.

Evaluation of organogenic responses *in vitro* in pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch].

Contreras Pinto Marco Alberto¹, Arreola-Ávila Jesús².

ABSTRACT

Pecan is propagated through seed because its vegetative multiplication is difficult. In this study bud explants of this species originated from young and old trees were cultivated *in vitro*. Positive and negative organogenic responses were obtained. Positive responses were obtained in nodal segment explants originated from juvenile trees, while not tissue differentiation was observed in explants originated from old trees. Culture medium Murashige and Skoog (1962) of inorganic salts at 100% and woody plant medium containing thiamine, 0.40 mgL⁻¹, myo-inositol 100 mgL⁻¹, L- cysteine 60 mgL⁻¹, and saccharose at 3% were used. It was observed 25% of oxidized explants originated from juvenile trees, compared to 36.7% of explants with similar characteristics originated from adult trees. Number of leaves and shoots elongation was induced by kytetin, 1 mgL⁻¹ and 3 mgL⁻¹; 2-isopentenyl adenine, 3 mgL⁻¹ and 1mgL⁻¹; and indol butyric acid, 0.3 mgL⁻¹ addition.

Key words: organogenesis, culture medium, bud explants, juvenile trees, old trees.

¹Tesista

²Director

ÍNDICE CONTENIDO

ÍNDICE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
INTRODUCCIÓN	2
1.1 Objetivo General.....	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 Descripción morfológica del Nogal	4
2.3 Requerimientos nutrimentales del Nogal	7
2.4 Distribución geográfica	7
2.5 Producción a nivel mundial	8
2.5.1 Producción en México.....	8
2.6 Problemática del nogal	9
2.7 Propagación del Nogal	10
2.7.1 Propagación vegetativa	10
2.7.2 Micropropagación.....	10
2.7.2.1 Desventajas de la micropropagación	11
3.1 Biotecnología vegetal.....	11
3.1.1 Cultivo de tejidos vegetales	12
3.1.2 Embriogénesis.....	13
3.1.3. Organogénesis	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Lugar y área de estudio	16
4.2 Material Vegetal.....	16
4.3 Toma de Muestras.....	17

4.4 Metodología.....	17
4.4.1 Organogénesis directa en plantas juveniles, fase I.....	17
RESULTADOS Y DISCUSION	21
5.1 Plantas juveniles fase I	21
5.1.1 Respuestas y oxidación	21
5.1.2 Inducción de brotes.....	22
5.1.3 Inducción de formación de hojas	23
5.1.4 Longitud de brotes	24
5.2 Plantas adultas fase II	26
5.2.1 Respuestas y oxidación	26
5.3 Conclusiones	27
LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nuez sin pericarpio y mesocarpio	6
Figura 2. Nuez con pericarpio y mesocarpio	6
Figura 3. Inicio de oxidación en explante del cultivado en medio WPM al 100%..	21
Figura 4. Explantes con respuesta organogénica (brotes y hojas), A se aprecian 2 brotes, B se presenta brotación simple.....	22
Figura 5. Media obtenida de brotes en explantes de yemas cultivados durante 8 semanas en medio MS-62 al 100%	23
Figura 6. Media de hojas obtenidas por explante durante 8 semanas en medio MS-62 al 100%	24
Figura 7. Diferenciación en la elongación de brotes en explantes con 45 días de incubación a 25°C con fotoperiodo de 16:8	25
Figura 8. Media longitud de brotes en cm obtenidas por explante durante 8 semanas en medio MS-62 al 100%	25
Figura 9. Explante proveniente de plantas adultas que presentó potencial de respuesta organogénica	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cantidad de nutrimentos requeridos por hectárea. (Sparks, 1977).	7
Cuadro 2. Tratamientos empleados para la evaluación de respuestas organogénicas <i>in vitro</i> de nogal pecanero <i>Carya illinoensis</i>	18
Cuadro 3. Tratamientos empleados en el experimento 1 para la evaluación de respuestas organogénicas <i>in vitro</i> en plantas adultas de nogal pecanero <i>Carya illinoensis</i> [Wangehn C. (Koch)].	19
Cuadro 4. Tratamientos empleados en el experimento 2 para la evaluación de respuestas organogénicas <i>in vitro</i> en plantas adultas de nogal pecanero <i>Carya illinoensis</i> [Wangehn C. (Koch)].	20
Cuadro 5. Datos obtenidos después de 8 semanas en medio MS-62 al 100%	26

INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero representa uno de los principales cultivos en México debido a la importante generación de divisas, así como el contexto social en que se produce. En México, la superficie plantada con nogal pecanero es de 115 mil ha, las cuales se distribuyen en los estados de Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León principalmente (Ojeda, 2010; Ávila *et al.*, 2014).

La propagación del nogal pecanero regularmente se lleva a cabo a través de la gemación de semillas para obtener material porta injerto. La propagación sexual en esta especie es lenta y segrega individuos con variación fenotípica considerable, característica que limita la homogeneidad de los portainjertos utilizados en las plantaciones comerciales (Moore *et al.*, 2009). No existe a la fecha una técnica para producir nogales vegetativamente, no obstante se han llevado a cabo experimentos iniciales en México, en los cuales se han explorado diversos órganos del árbol, como lo son varetas de brotes y raíces y los resultados no han sido satisfactorios (Arreola, 2002).

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida para producir a nivel industrial o semi-industrial plantas clónales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma de importancia comercial y biológica, estas técnicas de cultivo de tejido se aplican para la micropropagación y producción de plantas libres de patógenos, el éxito en la propagación *in vitro* requiere una comprensión

de las necesidades específicas y la manipulación precisa de varios factores (Gonçalves *et al.*, 1998).

La propagación *in vitro* ofrece un gran potencial para la industria de la nuez mediante la multiplicación a gran escala de clones seleccionados con características de importancia económica o biológica y a su vez permite la producción de una alta cantidad de plántulas en un periodo de tiempo muy corto (Renukdas *et al.*, 2010). En México se estableció recientemente un protocolo para micropropagación en nogal pecanero en el cual se obtuvieron resultados significativos en la generación de brotes, hojas y mayor crecimiento en las plántulas, sin embargo no se reporta resultados que favorezcan la generación de raíces (Ávila *et al.*, 2014).

Actualmente existe dificultad para propagar vegetativamente árboles adultos de nogal pecanero por métodos tradicionales. Es por eso que la micropropagación *in vitro* se convierte en una herramienta potencial para la obtención de nuevas plantas con características de interés biológico. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo que permitiera propagar materiales adultos a partir de segmentos de yemas axilares.

1.1 Objetivo General

Evaluar las respuestas organogénicas *in vitro* de explantes de segmentos nodales de plantas adultas y juveniles de nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch].

1.2 Objetivos específicos

- Determinar el tratamiento que promueva la mayor formación de hojas.
- Determinar el tratamiento que promueva la mayor formación y elongación de los brotes.
- Evaluar la tasa de oxidación de explantes.

1.3 Hipótesis

El empleo de ácido indol butírico (AIB), 2 iso pentenil adenina (2-ip), benciladenina y Kinetina (KIN), no propician la generación *in vitro* de hojas y brotes, en explantes de nogal pecanero.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Antecedentes

El Nogal *Carya illinoensis* Koch, es una especie frutal perteneciente al grupo de las nueces; miembro de la familia *Juglandaceae*, la misma del nogal común *Junglans regia*. (Lemus, 2004). En América del Norte el nogal pecanero o nuez pecanera se extiende por Texas y Norte de México (Grant, 2000).

2.2 Descripción morfológica del Nogal

El nogal pecanero es un árbol de hoja caduca que mide desde 30.48 m hasta los 42.67m de altura en promedio. Las hojas son alternas, lanceadas, dentadas y miden de 10 a 20cm de largo en promedio (USDA-NRCS, 2013). Posee la característica de ser vigoroso y longevo, el cual inicia su vida productiva entre los 6 a 10 años de edad y continua produciendo en niveles óptimos y comerciales durante poco más de 50 años, aun y cuando con un buen manejo técnico adecuado se puede alargar su vida productiva teniendo casos de árboles que duran hasta 100 años (COMENUEZ, 2013).

• **Flor:** Las flores son unisexuales, ambos sexos nacen en racimos separados en el mismo árbol. Al ser una especie de polinización anemófila, el nogal presenta un hábito de floración diclino monoico, lo que significa que genera inflorescencias masculinas, o amentos, y flores femeninas dentro del mismo árbol. Sin embargo, la aparición de las flores dentro del árbol no ocurre siempre simultáneamente, lo que se conoce como dicogamia. El estado de

las flores femeninas (los estigmas), da una idea de la receptividad de la flor, así como la apariencia de los amentos da una idea de la producción de polen (USDA-NRCS, 2013)

• **Fruto:** El fruto es de color marrón oscuro y cubierto de escamas amarillas. La cáscara es delgada y frágil. La cáscara a menudo persiste en la rama en el invierno después de la caída de la nuez (USDA-NRCS, 2013). Se considera una drupa (fruto carnoso que contiene una sola semilla), la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra). El Pericarpio y el Mesocarpio es una estructura segmentada en 4 partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla. A la porción del mesocarpio y endocarpio se le conoce como ruezno. Las nueces compuestas por el endocarpio y la semilla normalmente miden de 2 a 6 cm. de largo y pesan de 4 a 12 gramos cada una. La semilla presenta dos cotidélones separados por un tabique central, los cuales provienen de los carpelos florales. El fruto del nogal es una nuez de alto valor nutritivo, cuya almendra es rica en proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas, fibras y grasas (con 94% de aceites insaturados, que reducen el nivel de colesterol en la sangre) (COMENUEZ, 2013).

• **Nuez:** La nuez se considera una drupa (fruto carnoso que contiene una sola semilla), la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra). Durante la fase de maduración el pericarpio y el mesocarpio se secan y el endocarpio (cáscara) y la semilla (almendra) son consideradas como la nuez.

El pericarpio y el mesocarpio es una estructura segmentada en 4 partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla. La semilla presenta dos cotiledones separados por un tabique central, los cuales provienen de los carpelos florales. Es una nuez de alto valor nutritivo, cuya almendra es rica en proteínas, carbohidratos, grasas (con 94% de aceites insaturados, que reducen el nivel de colesterol en la sangre), minerales, vitaminas y fibras (COMENUEZ, 2013). Esta drupa mide de 2.5 a 4.5 centímetros de longitud (Lemus, 2004), y pesan de 4 a 12 gramos cada una. La nuez es de forma oblonga, lisa, de cáscara delgada y puntiaguda. Su periodo de desarrollo es largo y se extiende aproximadamente por siete meses (Figura 1 y 2). (Lemus, 2004)



Figura 2. Nuez sin pericarpio y mesocarpio



Figura 1. Nuez con pericarpio y mesocarpio

- **Raíz:** Su sistema radical, en condiciones naturales, puede penetrar a una profundidad de 10 metros, pero en general, en el caso de establecimientos comerciales la mayoría de las raíces se encuentran a 1.2 metros. Los

nogales en su hábitat natural tienen una asociación con hongos no dañinos altamente especializados en las raíces alimentadoras.

2.3 Requerimientos nutrimentales del Nogal

El nogal pecanero requiere de 17 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas. No obstante el nitrógeno y el zinc son los nutrientes a los que presenta mayor respuesta en crecimiento y calidad. En el norte de México las aplicaciones más frecuentes son de nitrógeno, fósforo, potasio y zinc. (Sparks, 1977)

Nutriente	Kg nutrientes/ha
Nitrógeno	17.06
Fosforo	3.86
Potasio	7.38
Calcio	6.52
Magnesio	0.98
Manganeso	0.138
Hierro	0.054
Boro	0.02
Cobre	0.016
Zinc	0.056
Molibdeno	0.0036

Cuadro 1. Cantidad de nutrimentos requeridos por hectárea. (Sparks, 1977).

2.4 Distribución geográfica

El nogal pecanero es una especie nativa de Iowa, Indiana, Alabama, Texas y el norte de México. Este árbol es caracterizado por seguir las cuencas de los ríos muy de cerca, sobre todo a lo largo del Mississippi y sus afluentes, el río Colorado, y algunos otros ríos en Texas, de igual forma se ha encontrado a lo largo de algunos ríos en México. Otros países que también se dedican a

cultivar el nogal pecanero son Australia, Brasil, Perú, Israel y Sudáfrica (Venkatachalam, 2007).

2.5 Producción a nivel mundial

Existen varios países productores de nuez proveniente del nogal pecanero, entre los cuales Estados Unidos de América ocupa el primer lugar con una producción de 113 mil toneladas anuales en promedio, lo cual representa el 78.6% de la cosecha a nivel mundial, en segundo lugar esta México con una producción media anual calculada en 28,274 toneladas, lo que equivale al 19.6% de la producción mundial y por último destacan dentro de los países con menor producción Australia, Israel y Sudáfrica, que en conjunto aportan el 1.8% de la producción mundial (SAGARPA, 2013).

2.5.1 Producción en México

De acuerdo a cifras oficiales el cultivo de nogal se distribuye principalmente en 5 estados de la zona norte de la República Mexicana (Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León) (SAGARPA, 2013). En México la producción de nuez en condiciones de riego pasó de 19.9 t ha⁻¹ en 1980 a 37.8 y 68.9 t ha⁻¹ en 1990 y 2003 respectivamente, ya en el año 2012 el rendimiento cayó a 68.4 t ha⁻¹. El incremento en la productividad se atribuyó a la introducción de nuevas variedades y al mejor manejo fitosanitario del cultivo (SAGARPA, 2013).

2.6 Problemática del nogal

Entre los problemas que tienden a hacer decaer la producción de nuez, resalta el paulatino aumento en la concentración salina del agua que se emplea para regar las parcelas productivas, este fenómeno se ha asociado a las constantes sequías que se presentan en la zona norte de México, la cual resalta por contar con la mayor superficie cultivada de nogal pecanero en el país. De igual manera se ha evidenciado que el sistema de riego por goteo influye en el aumento de la concentración de sales en el suelo, dado que al efectuarse la técnica no se aplica un lavado de suelo, resulta de interés mencionar los aspectos anteriores debida a que el nogal es un cultivo con alta sensibilidad a los iones Cloruro y Sodio principalmente (Miyamoto *et. al*, 1985; Miyamoto, 2006).

Otro de los problemas que se presentan en cultivo es la dificultad para enraizar, debido a que regularmente la propagación del nogal pecanero se da a través de la gemación de semillas para obtener material porta injerto o de injerto, otra alternativa para la producción es la propagación por esquejes a partir de árboles maduros, lo que permite la producción de portainjertos clonales, sin embargo, es muy difícil mantener producciones rentables debido a la baja capacidad de enraizamiento del cultivo (Arreola, 2002; Herrera, 1988).

En relación a lo anterior, es preciso señalar que la variabilidad genética es algo muy común en los nogales pecaneros, debido a que las flores masculinas y femeninas se encuentran en diferentes partes en el mismo

árbol, lo que propicia que la polinización sea casi completamente “cruzada” dando como resultado final un alto grado de heterocigocidad, con endogamia severa cuando autofecunda (Cerna *et. al*, 2003).

2.7 Propagación del Nogal

2.7.1 Propagación vegetativa

La propagación del nogal pecanero regularmente se da a través de la gemación de semillas para obtener material porta injerto, otra alternativa para la producción es la propagación por esquejes a partir de árboles maduros, lo que permite la producción de portainjertos clonales, sin embargo, es muy difícil mantener producciones rentables debido a la baja capacidad de enraizamiento del cultivo (Arreola, 2002; Herrera, 1988). La propagación sexual en esta especie es lenta y segrega individuos con variación fenotípica considerable, característica que limita la homogeneidad de los portainjertos utilizados en las plantaciones comerciales (Moore *et al.*, 2009).

2.7.2 Micropropagación

El cultivo de tejidos en su acepción amplia puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta técnica forma parte de la amplia gama de tecnologías que conforman a la Biotecnología. (Levitus, 2010).

2.7.2.1 Desventajas de la micropropagación

La organización celular que caracteriza a un órgano, se puede lograr mediante la aplicación de reguladores de crecimiento con el objetivo de mantener su integridad y funcionamiento en el cultivo *in vitro*, para evitar posibles mutaciones (variación somaclonal). Las principales limitantes en esta técnica son la contaminación (Hongos, Bacterias, Virus, Mycoplasmas, Microartrópodos y Trips) y la oxidación (Estopa, 2005). Las especies leñosas presentan dificultad para ser propagadas de manera eficiente *in vitro*, entre sus principales problemáticas destaca una capacidad regenerativa menor en comparación con otro tipo de planta, la dormancia de las yemas, la Inducción de rejuvenecimiento, menor tasa de multiplicación, mayor oxidación inicial del explante, desinfección más complicada, inducción pobre de enraizamiento y aclimatación limitante entre otras.

3.1 Biotecnología vegetal

La biotecnología tradicional no está limitada a las aplicaciones que involucren microorganismos, inclusive la modificación genética, es una de las más recientes vertientes que se involucran en el rango de estudio de la biotecnología, las plantas han estado relacionadas en el desarrollo de la humanidad a lo largo del tiempo, en el cual han siendo aprovechadas principalmente como fuente de comida y como aporte de fibras para elaborar diversas herramientas y prendas de vestir, bajo ese contexto se puede

enmarcar la importancia del desarrollo que la biotecnología vegetal ha tenido de manera simultánea con el de la humanidad (Hopkins, 2007).

De acuerdo a ArgenBio (2014), dentro de la biotecnología vegetal se pueden enlistar diversas ramas de estudio, tales como:

- Resistencia a plagas y enfermedades
- Resistencia a herbicidas
- Mejora de propiedades nutritivas
- Resistencia a estrés abiótico
- Cultivo de tejidos vegetales

3.1.1 Cultivo de tejidos vegetales

Las tecnologías de propagación *in vitro* se están expandiendo constantemente en el campo de la biología, el título de cultivo de tejidos vegetales, se ha divulgado de manera muy extensa, a pesar de que anteriormente era difícil cultivar células u órganos vegetales por separado, ahora es posible gracias al desarrollo de esta tecnología, alrededor del mundo se han realizado diversos trabajos en los cuales se emplean diferentes tejidos de la planta con la intención de regenerar individuos a partir de: hojas, yemas axilares, semillas, embriones, callos inducidos, entre otros (Rathore *et. al*, 2004). Las técnicas de micropropagación se pueden clasificar inclusive en función del tejido empleado.

Las técnicas de micropropagación constituyen una herramienta importante para la rápida propagación de numerosas especies vegetales de interés

forestal y en horti-fruticultura. Sin embargo, aunque estas metodologías se aplican con éxito a algunas especies vegetales, otras presentan problemas de supervivencia y crecimiento cuando las plantas se llevan a condiciones normales de campo. Uno de los estadios más críticos en los procesos de micropropagación es el paso de las plántulas desde la fase *in vitro* a las condiciones de crecimiento *ex vitro* (Azcón, 2009).

3.1.2 Embriogénesis

Teóricamente, es el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en las cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método. (Freire, 2003).

Este proceso por el cual se generan embriones a partir de células somáticas, implica importantes cambios a nivel molecular, tales como la expresión coordinada de aquellos genes que controlan el cambio del patrón de desarrollo vegetativo a un patrón de desarrollo embriogénico. Tanto el establecimiento de un estado totipotente en las células somáticas para iniciar el desarrollo de un embrión, como las diferentes etapas de desarrollo que

darán lugar al embrión somático, requieren una reprogramación de los patrones de expresión génica y una expresión temporal de genes específicos. (Sánchez *et. al*, 2009).

3.1.3. Organogénesis

Es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. De la organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Levitus, 2010).

Anaya y sus colaboradores (2011), evidencian el contraste de la organogénesis con la embriogénesis somática, debido a que en la vía organogénica para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes, inhiben la formación de raíces y viceversa, mientras que en la embriogénesis no es indispensable proceder a sembrar en medios de cultivo con diferentes tratamiento para el desarrollo de los órganos y la raíz, ya que en el medio en el cual se estableció el individuo es posible llevar a cabo el proceso completo de regeneración.

3.1.3.1 Organogénesis directa

La regeneración in vitro de plantas mediante organogénesis directa es altamente deseable en los trabajos de micropropagación y de conservación de germoplasma, debido a la generación de órganos y tejidos sin necesidad de formación previa de callo (Dolce *et. al*, 2004).

3.1.3.2 Organogénesis indirecta

Por otra parte la organogénesis indirecta, implica la producción masiva de plántulas a partir de embriones u órganos inducidos en tejido de callo. La proliferación de callos a partir de un explante en particular, es el resultado de la activación mitótica de un pequeño grupo de células colocadas normalmente en la superficie de corte del explante (Anaya *et. al*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Lugar y área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos fases, la primera fase se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo en la ciudad de Texcoco Estado de México en donde se trabajó con explantes provenientes de plantas juveniles, mientras que la segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología en el área de cultivo de tejidos vegetales de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) ubicada en Bermejillo Durango trabajando con explantes procedentes de plantas adultas.

4.2 Material Vegetal

Se emplearon plantas juveniles que fueron germinadas en el invernadero de la URUZA y posteriormente fueron trasladadas a los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, donde se les aplicó una solución de Captan® al 1% en agua de riego durante 2 semanas. El material vegetal evaluado en la URUZA procedió de árboles adultos establecidos en el municipio de Nazas y Bermejillo Durango, de los cuales se cortaron ramas que contaban con brotes recientes y poseían yemas axilares con activa división celular, la colección de los materiales adultos se llevó a cabo en distintas fechas del mes de Abril y Mayo de 2014, mientras que la germinación de las plantas juveniles se dio en la fecha de febrero de 2013.

4.3 Toma de Muestras

Se cortaron con tijeras yemas axilares viables para la micropropagación, el material recién cortado se suspendió en una solución antioxidante que contenía 150 mgL^{-1} de ácido cítrico y 100 mgL^{-1} de ácido ascórbico. Los segmentos obtenidos fueron extraídos de la solución antioxidante para ser suspendidos en una solución de alcohol al 70% durante 10 minutos, después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% (clorox®), por último se procedió a enjuagar tres veces los explantes con agua estéril.

4.4 Metodología

El diseño experimental del estudio corresponde a un diseño completamente al azar, las variables respuesta analizadas fueron: oxidación de los explantes, número de brotes por explante, número de hojas por explante y longitud de brotes, se realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey con un $\alpha=0.5$, los análisis estadísticos fueron procesados en el programa Statgraphics versión 16.1.15.

4.4.1 Organogénesis directa en plantas juveniles, fase I

Se emplearon yemas axilares que medían 1.5 cm aproximadamente y fueron cultivadas en las sales inorgánicas medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS-62) al 100%, adicionado con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , 60 mgL^{-1} de L- Cisteina, 10 mgL^{-1} de Kinetina y 3% de sacarosa, los explantes fueron sumergidos completamente

en el medio y fueron incubados en oscuridad a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 horas. Posterior a las 72 h de suspensión en el medio, el material vegetal se sembró bajo dos tratamientos con doce repeticiones (Cuadro 1), se empleó el medio MS-62 al 100% enriquecido con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , 60 mgL^{-1} de L- Cisteína, 0.3 mgL^{-1} de AIB y 3% de sacarosa, se emplearon Kinetina y 2 isopenteniladenina los cuales fueron adicionados en concentraciones diferentes como se muestra en el cuadro 2, finalmente los explantes fueron incubados a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, y un fotoperiodo de 16:8 (16 h luz y 8 h de oscuridad). Las respuestas organogénicas en explantes provenientes de plantas juveniles fueron evaluadas transcurridas 8 semanas, las variables respuesta analizadas fueron la formación de hojas, la formación de brotes y la elongación de los brotes, para la evaluación de la oxidación se consideró el cambio de coloración de color verde a tonos cafés en los explantes.

Cuadro 2. Tratamientos empleados para la evaluación de respuestas organogénicas *in vitro* de nogal pecanero *Carya illinoensis*.

Tratamiento	KIN mgL^{-1}	2ip mgL^{-1}
Testigo	0	0
1	1.0	3.0
2	3.0	1.0

4.4.3 Organogénesis directa en plantas adultas, fase II

Se establecieron dos experimentos por separado, en el experimento uno se empleó el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) al 100%, suplementado con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol

100 mgL⁻¹, 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de Agar-Agar, ajustado a un PH de 5.7±0.2, se probaron 4 tratamientos y un testigo con 12 repeticiones para cada uno (Cuadro 3). Para el experimento dos se empleó el medio de cultivo MS (1962) al 100%, suplementado con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL⁻¹, Myo-inositol 100 mgL⁻¹, 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de Agar-Agar, ajustado a un PH de 5.7±0.2, en donde se probaron 4 tratamientos y un testigo con 12 repeticiones para cada uno (Cuadro 4). Los tratamientos probados contenían para su evaluación AIB a concentración de 0 y 0.3 mgL⁻¹, BA a 0 y 1 mgL⁻¹ al igual que dos antioxidantes diferentes (carbón activado y nitrato de plata), para ambos experimentos se establecieron explantes de segmentos nodales con un diámetro aproximado de 0.5 cm y una longitud no mayor a los 1.5 cm, los explantes establecidos fueron incubados con un fotoperiodo de 16 h luz, a una temperatura de 26°C±2°C.

Cuadro 3. Tratamientos empleados en el experimento 1 para la evaluación de respuestas organogénicas *in vitro* en plantas adultas de nogal pecanero *Carya illinoensis* [Wangehn C. (Koch)].

Tratamiento	Medio de cultivo	Antioxidante	BA	AIA
			mgL ⁻¹	
0	WPM	0	0	0
1	WPM	CA 1%	1	.3
2	WPM	CA 1%	1	0
3	WPM	AgNO ₃ 1%	1	.3
4	WPM	AgNO ₃ 1%	1	0

Cuadro 4. Tratamientos empleados en el experimento 2 para la evaluación de respuestas organogénicas *in vitro* en plantas adultas de nogal pecanero *Carya illinoensis* [Wangehn C. (Koch)].

Tratamiento	Medio de cultivo	Antioxidante	BA	AIA
			mgL ⁻¹	
0	MS	0	0	0
1	MS	CA 1%	1	.3
2	MS	CA 1%	1	0
3	MS	AgNO ₃ 1%	1	.3
4	MS	AgNO ₃ 1%	1	0

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Plantas juveniles fase I

5.1.1 Respuestas y oxidación

El porcentaje de oxidación se evaluó transcurridos 40 días después de la siembra in vitro de los explantes, en el tratamiento 0 (testigo) y tratamiento 1 (1 mgL^{-1} KIN, 3 mgL^{-1} 2ip y 0.3 mgL^{-1} AIB), la oxidación se presentó en el 25% de los explantes, mientras que en el tratamiento 2 (3 mgL^{-1} KIN, 1 mgL^{-1} 2ip y 0.3 mgL^{-1} AIB) se presentó en 8.33% de las unidades experimentales. No obstante el porcentaje de respuesta organogénica fue de 33.33% para los tratamientos 1 y 2, mientras que en el tratamiento testigo se promovieron respuestas organogénicas en 25% de los explantes.



Figura 3. Inicio de oxidación en explante cultivado en medio WPM al 100%, suplementados con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , 3% de sacarosa, 8 gL^{-1} de Agar-Agar, ajustado a un PH de 5.7 ± 0.2 , adicionado con 1 mgL^{-1} de BA, 0 mgL^{-1} de AIB y 1% de carbón activado

5.1.2 Inducción de brotes

La inducción de brotes en los tres tratamientos resultó estadísticamente igual, logrando diferenciar 2.25 brotes en promedio por planta para los tratamientos 1 y 2 mientras que para el control el promedio fue de 1.33 brotes en promedio por explante, no obstante se ha documentado que el empleo de BA a una concentración de 3.0 mgL^{-1} en combinación con el medio de cultivo WPM y a partir de embriones germinados *in vitro* de *Carya illinoensis* puede generar hasta 9.66 brotes en promedio por explante (Renukdas *et al.*, 2010), se ha observado también que la combinación de BA ($4.4 \text{ } \mu\text{M}$) y AIB ($0.005 \text{ } \mu\text{M}$) promueven el crecimiento de brotes laterales en explantes provenientes de plantas elite de *Juglans regia*, (Scaltsoyiannes *et. al*, 1998). De acuerdo a la evidencia se asume que la capacidad de respuesta del explante está asociada con la edad de la planta donante del explante al igual que con la cantidad, concentración y combinación de las hormonas empleadas.

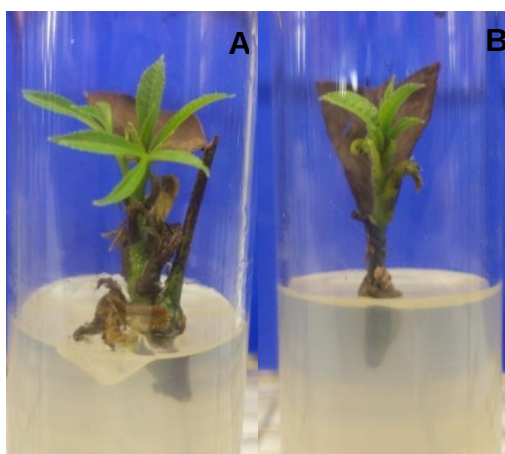


Figura 4. Explantes con respuesta organogénica (brotes y hojas), A se aprecian 2 brotes, B se presenta brotación simple.

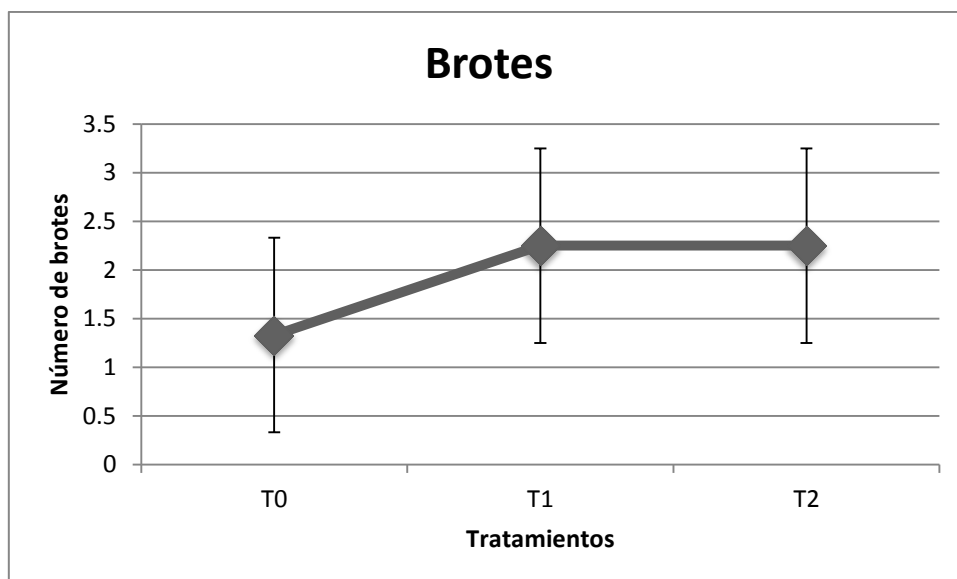


Figura 5. Media obtenida de brotes en explantes de yemas cultivados durante 8 semanas en medio MS-62 al 100% enriquecido con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , 60 mgL^{-1} de L-Cisteína, y 3% de sacarosa, tratamiento 0 (0 mgL^{-1} KIN y 0 mgL^{-1} 2ip) tratamiento 1 (1 mgL^{-1} KIN y 3 mgL^{-1} 2ip) Tratamiento 2 (3 mgL^{-1} KIN y 1 mgL^{-1}).

5.1.3 Inducción de formación de hojas

Los tratamiento 1 y 2 que presentan diferencia significativa con respecto al control, logrando generar 5 y 6 hojas respectivamente en promedio por explante (Figura 5), resultado similar al reportado por Ávila *et al.* (2013), quienes obtuvieron 6 hojas en promedio por explante mediante el empleo de KIN 1.0 mgL^{-1} , BAP 3.0 mgL^{-1} y ANA 0.3 mgL^{-1} . Se ha documentado que el empleo de Ácido indol acético a una concentración de 3.0 mgL^{-1} en medio MS modificado promueve la generación de 5 hojas en promedio en otra especie leñosa como es el cedro *Cedrela odorata L.* (García *et al.*, 2011).

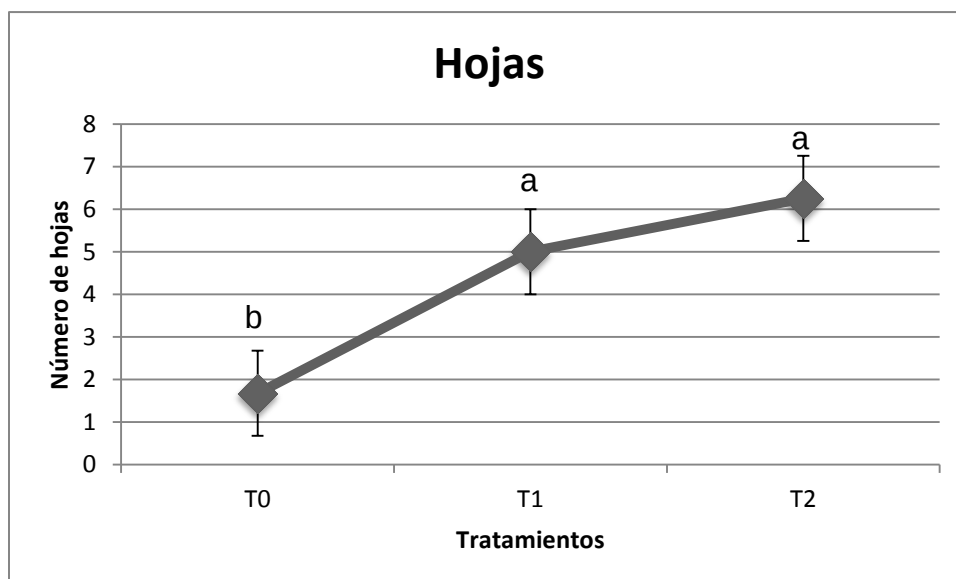


Figura 6. Media de hojas obtenidas por explante durante 8 semanas en medio MS-62 al 100% enriquecido con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , 60 mgL^{-1} de L- Cisteína, y 3% de sacarosa. Tratamiento 0 (0 mgL^{-1} KIN y 0 mgL^{-1} 2ip) tratamiento 1 (1 mgL^{-1} KIN y 3 mgL^{-1} 2ip) Tratamiento 2 (3 mgL^{-1} KIN y 1 mgL^{-1}). Los tratamientos 1 y 2 presentan diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $\alpha=95.0$).

5.1.4 Longitud de brotes

La mayor longitud de brotes se promovió en el tratamiento 1 (Figura 6), que involucra KIN 1.0 mgL^{-1} , 2ip 3.0 mgL^{-1} y AIB 0.3 mgL^{-1} , elongando los brotes fue de 1.65 cm en promedio, no obstante las diferencias entre los tratamientos 1 y 2 fueron no significativas, el resultado obtenido es similar al reportado por Suárez *et al.*, (2006) en Cedro, que cita la elongación en promedio a los 1.5 cm en 5 tratamientos distintos que emplearon BAP a concentraciones de 0, .5, 1.0, 2.0 y 4.0 mgL^{-1} .

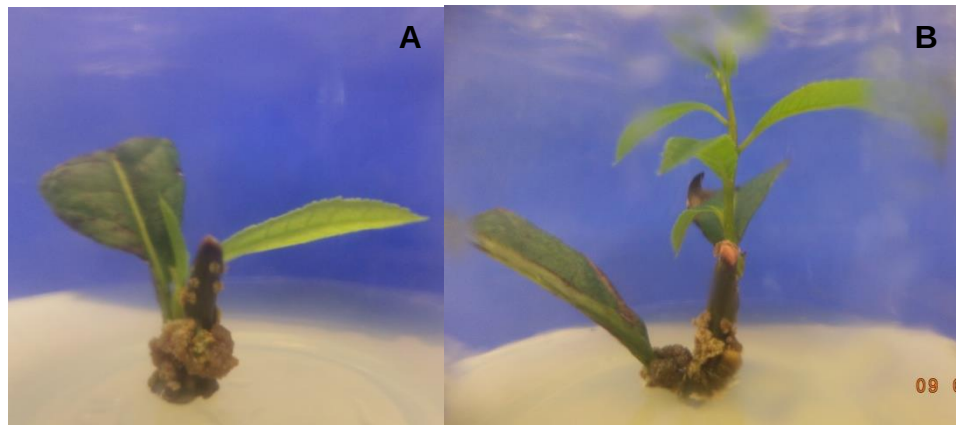


Figura 7. Diferenciación en la elongación de brotes en explantes con 45 días de incubación a 25°C con fotoperiodo de 16:8, (A) Tratamiento testigo, (B) Tratamiento 1 (KIN 1.0 mgL⁻¹, 2ip 3.0 mgL⁻¹ y AIB 0.3 mgL⁻¹).

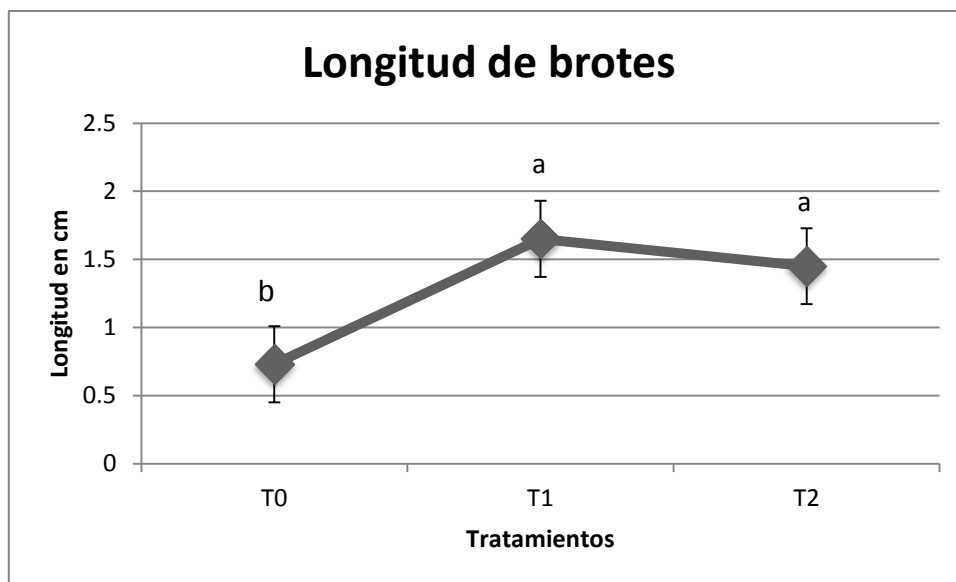


Figura 8. Media longitud de brotes en cm obtenidas por explante durante 8 semanas en medio MS-62 al 100% enriquecido con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL⁻¹, Myo-inositol 100 mgL⁻¹, 60 mgL⁻¹ de L-Cisteína, y 3% de sacarosa tratamiento 0 (0 mgL⁻¹ KIN y 0 mgL⁻¹ 2ip) tratamiento 1 (1 mgL⁻¹ KIN y 3 mgL⁻¹ 2ip) Tratamiento 2 (3 mgL⁻¹ KIN y 1 mgL⁻¹) los tratamientos 1 y 2 presentan diferencias significativas con respecto al control (Tukey, $\alpha=95.0$).

Tratamiento	Combinación de reguladores mgL ⁻¹			Brotes	Hojas	Longitud brotes (cm)
	KIN	2ip	AIB			
0	0	0	0	1.33±0.50a	1.6±.85b	.73±0.15b
1	1.0	3.0	0.3	2.25±0.43a	5.0±.73a	1.65±0.13a
2	3.0	1.0	0.3	2.25±0.43a	6.25±0.73a	1.45±0.13a

Cuadro 5. Datos obtenidos después de 8 semanas en medio MS-62 al 100% enriquecido con Tiamina a una concentración de 0.40 mgL⁻¹, Myo-inositol 100 mgL⁻¹, 60 mgL⁻¹ de L-Cisteína, y 3% de sacarosa, letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas ($\alpha=95.0$).

5.2 Plantas adultas fase II

5.2.1 Respuestas y oxidación

Como respuestas organogénicas, fueron consideradas aquellas que presentaban cambio en la coloración y morfología de la yema, los explantes evaluados que provenían de plantas adultas no lograron desarrollar ni diferenciar tejidos como hojas y brotes en el periodo de tiempo de 60 días, que comprendió el estudio.

La oxidación en el experimento uno, afectó a 24 unidades experimentales (UE) representando en porcentaje 40%, la contaminación se presentó en 16 UE lo que corresponde al 26.67% del total. En el experimento dos la oxidación se contabilizó en 20 UE (33%) y la contaminación en 23 UE (38.33%). Por otra parte 42 explantes presentaron respuestas potenciales a la organogénesis (35%), sin embargo no lograron diferenciar tejido que pudiera ser evaluado de manera cuantitativa, debido a que transcurridos 60 días de incubación y posterior a 2 transferencias a medio (WPM) al 100%

con Tiamina a 0.40 mgL^{-1} , Myo-inositol 100 mgL^{-1} , sacarosa al 3%, Agar-Agar a 8 gL^{-1} y 1 mgL^{-1} BA, a PH de 5.7 ± 0.2 , la oxidación propicio que no se lograra otra transferencia.

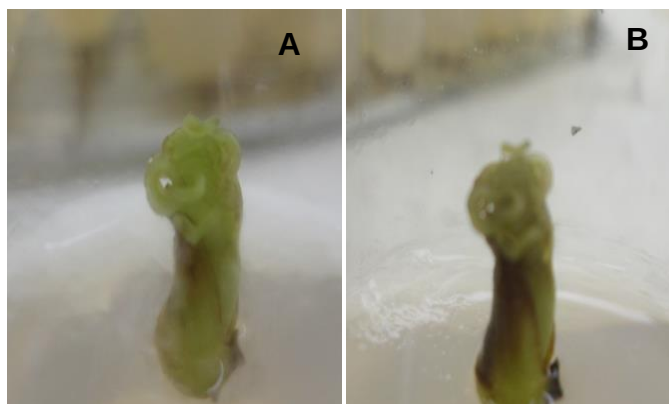


Figura 9. Explante proveniente de plantas adultas que presentó potencial de respuesta organogénica, en la figura 3A se observa al explante antes de la primera transferencia (15 días transcurridos), en la figura 3B se aprecian daños por oxidación transcurridos 45 días de incubación.

5.3 Conclusiones

El presente estudio demostró la capacidad para propiciar la generación de hojas, brotes y su elongación en explantes de plantas juveniles de nogal pecanero *in vitro* mediante el empleo de Kinetina, 2 iso pentenil adenina y Ácido indol butírico. La contaminación y la oxidación fueron las principales causas de perdida de explantes. La nula respuesta organogénica en explantes de plantas adultas puede estar asociada a la baja concentración empleada de Bencil adenina en los experimentos.

LITERATURA CITADA

1. Anaya, J., Ochoa, A., Martínez, H., Moreno, S. (2011). Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora.
2. Arreola, J., Lagarda A. (2002). Propagación. Tecnología de producción en nogal pecanero. Libro técnico No. 3. CELALA-CIRNOC-INIFAP. Accesado al 20 de Mayo de 2013 en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1967/Tecnologia%20de%20produccion%20de%20nogal%20pecanero.pdf?sequence=1>
3. Ávila J., Arreola, J., Rodríguez, J., Trejo, R., Valdez, R., Borja, A. (2013). Respuestas morfogénicas en la propagación in vitro de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 469-481.
4. Azcón, A. (2009). Micorrizas en micropropagación y sus aplicaciones potenciales. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, España. Accesado al 20 de Mayo de 2013 en: <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20SECIVTV.pdf>
5. Brutsch, M., Allan, P., Wolstenholme, B. (1977) The anatomy of adventitious root formation in adult phase pecan [*Carya illinoensis* (Wang) K. Koch] stem cuttings. Hort Res, 17, 23–31.

6. Cerna, J., Simpson J., Martinez, O., Martinez, R. (2003). Measurement of genetic diversity of native pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] populations established in Central Mexico and correlation with dichogamous flowering using AFLP. Food, Agr. & Env., 1, 168–173.
7. Comité Mexicano del Sistema producto Nuez, A.C (COMENUEZ). 2013. Aspectos técnicos del nogal. Programa de Desarrollo de Capacidades, Innovación Tecnológica y Extensionismo Rural. <http://www.comenuez.org/xoo/modules/tinycontent/index.php?id=2>
8. Corte, J., Phillips G., Nance, S. (1990). Micropropagation of pecan. Hort Science, 25, 1308.
9. Dolce, N., Scocchi, A., Mroginski, E., Mroginski, L. (2004). Organogénesis directa a partir de segmentos de hojas cotiledonares de *Citrus sinensis*. Universidad Nacional del Noreste. Argentina.
10. Estopa, M. (2005). El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Departamento I+D Cultius Roig. Revista EXTRA 2005. Accesado al al 20 de Mayo de 2013 en: <http://www.umoar.edu.sv/biblio/agricultura/viveros/El%20cultivo%20in%20vitro%20en%20la%20reproduccion%20vegetativa%20en%20plantas%20de%20vivero.pdf>
11. Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Cuba. Biotecnología Vegetal, 3.
12. García, R., Delgado, M., González, Y., González, A., Garriga, M., Caligari, P., Carrasco, B., Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of cedar (cedrela

- odorata L.) from juvenile shoots. Chilean journal of agricultural research, 71, 376-382.
13. Gonçalves, J., Diogo, G., Amancio, S. (1998). In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 27, 265-275.
 14. Grant, D. (2000). Pecan food potential in prehistoric North America. *Economic Botany. Biomedical and life Sciences*, 54.
 15. Hansen, K., Lazarte, J. (1984) In vitro propagation of pecan seedlings. *Hort Science*, 19, 237–239.
 16. Hassanen, S., Gabr, M. (2013). In vitro rooting of Pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). *World Applied Sciences Journal*, 21, 315-319.
 17. Herrera, E. (1988). Selecting and Storing Pecan Propagation Wood. Guide H-613. New Mexico State University. Accesado al 20 de Mayo del 2013 en: http://aces.nmsu.edu/pubs/_h/h-613.pdf
 18. Hopkins, W. (2007). *Plant Biotechnology*. 1era. Ed. Chelsea House publishers.
 19. Husain, M., Anis, M. (2009). Rapid in vitro multiplication of *Melia azadarach* L. (a multipurpose) woody tree. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 765-772.
 20. Lemus, S. (2004). Cultivo del pecano (*Carya illinoensis*). Ministerio de Agricultura INIA-LATINA. Chile. Pp. 5-7.

21. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio. Consejo Argentino para la información y Desarrollo de la Biotecnología). Accesado al 20 de Mayo del 2013 en: http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Indice_e_introduccion.pdf
22. Miyamoto, S. (2006). Diagnosis and Management of Salinity Problems In Irrigated Pecan Productions. Texas Water Resources Institute. Accesado al 20 de Mayo de 2013 en: <http://twri.tamu.edu/reports/2006/tr287.pdf>
23. Miyamoto, S., Gobran, G., Piela, K. (1985). Salt Effects on Seedling Growth and Ion Uptake of Tree Pecan Rootstock Cultivars. *Agronomy Journal*, 77, 383-388.
24. Ojeda et al. (2010). Análisis FODA y Perspectivas del cultivo del Nogal Pecanero en Chihuahua. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 14, 348-359.
25. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. México.
26. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, K. (2010). In vitro germination of Pecan (*Carya illinoensis*) embryo. *Biharean Biologist*, 4, 37-43.
27. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, K. (2011). In vitro propagation of walnut - A review. *African Journal of Biotechnology* 10, 290-311.
28. Phillips, G., Ramirez, J. (1983) Pecan tissue culture. In: 17th Western Pecan Conference, New Mexico State University Cooperative Extension

Service and Western Irrigated Pecan Growers Association, Las Cruces, New Mexico, 101–109.

29. Rathore, V., Shekhawat, N., Singh, P., Dagla, R. (2004) *Cloning of adult trees of Jamum* (*Syzygium cuminii*). Indian Journal of Biotechnology, 3, 241–245.
30. Renukdas, N., Manoharan, M., Garner, J. (2010). In vitro propagation of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). Plant Biotechnology, 27, 211–215.
31. Sánchez, C., Valladares, S., Vielba, J., Covelo, P., Rico, S., Vieitez, A. (2009). Caracterización y análisis del patrón de expresión de genes asociados con la embriogénesis somática de roble. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. España. Accesado al al 20 de Mayo de 2013 en: <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20SECIVTV.pdf>
32. Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panestos, K., Moulalis, D. (1998). Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). Journal Silvae Genetica, 46, 326–332.
33. Smith, E., Wolstenholme, B., Allan, P. (1974) Rooting and establishment of pecan [*Carya illinoensis* (Wang) K. Koch] stem cuttings. Agroplanta, 7, 21–28.
34. Sparks, D. (1977). Methods of predicting the nutrient needs for nut trees. 68th. Annual report of the Northern nut growers asociation. 25-30.

35. Suárez, I., Jarma, A., Ávila, M. (2006). Development of an in vitro propagation protocol for roble (*tabebuia rosea bertol dc*). *Temas agrarios*. 11, 52 – 62.
36. United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Services. (NRCS). (2013). Plant Guide PECAN *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. Mayo de 2013 en: http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_cail2.pdf
37. Venkatachalam, M., Kshirsagar, H., Seeram, P., Heber, D., Thompson, E., Roux, H., Sathe, K. (2007). Biochemical Composition and Immunological Comparison of Select Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9899-9907.
38. Wolstenholme, B., Allan, P. (1975) Progress and problems in pecan clonal propagation by stem cuttings. *Gewasproduksie/Crop Production*, 4, 29–32.