BIBLIOGRAFIA

Bermejo, V.B. 1982. Variación morfológica en características de hojas y conos de *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* Mtz. en poblaciones naturales de los altos de Chiapas. Bol. Téc. Inst. Nal. Invest. For. No. 74. México, 47 p.

Eguiluz Piedra, T. 1982. Clima y Distribución del Género *Pinus* en México. *Ciencia Forestal* 38(7): 30-44. 64 p.

FAO. 1982. Información sobre Recursos Genéticos Forestales No. 11. Roma 66 p.

Passini, Mie-Francoise. 1982. Les Forêts de *Pinus cembroides* s.l. au Mexique. Mission Arquéologique et Etnologique Francaise au Mexique; Etudes Mésoaméricaines II-5. Cahier No. 9. Pág. 14. París.

Reynoso, S.S. 1976. Estudios anatómicos de la madera de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Guadalajara. México. 39 p.

Rzedowski, J. 1964. Una especie nueva de Pino Piñonero del Estado de Zacatecas (México). *Ciencia*(México)23 (1): 17-20.

_____ 1981. Vegetación de México. Limusa. México. 432 p.

Estudio Morfogenético de Pinus maximartinezii

Alejandrina Robledo.

Víctor M. Villalobos A.

Resumen. El presente trabajo muestra los estudios preliminares llevados a cabo en el lab. de Biotecnología con el objetivo de determinar las mejores condiciones *in vitro* para la micropropagación de *Pinus maximartinezii*.
Se presentan resultados en la germinación en condiciones asépticas y efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los cotiledones.

INTRODUCCION

El cultivo de tejidos vegetales es una importante herramienta para la micropropagación de especies anuales y bianuales. En la actualidad, las firmas comerciales más importantes del mundo, multiplican clones en forma masiva en ornamentales, hortalizas y frutillas. Comparativamente, la micropropagación de especies perennes no ha progresado al mismo ritmo ya que se ha encontrado que los tejidos y órganos más diferenciados son poco sensibles a las condiciones *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1984).

Debido a los largos ciclos de las especies arbóreas, es fácil comprender el interés en micropropagarlas. Más aún, estos largos períodos de la etapa juvenil, han hecho muy difícil la aplicación de la genética convencional en el mejoramiento de los árboles. Aunado a esto, en muchos casos es muy difícil la continuidad de proyectos a largo plazo (Villalobos, Thorpe y Yeung, 1983).

La reproducción de árboles élite por medio del estacado, ha sido una alternativa importante en algunas especies como *Cryptomeria japonica* y *Picea*. Sin embargo, las experiencias con este tipo de programas indican que, en términos generales, el comportamiento de las estacas es afectado grandemente por la edad del árbol, su vigor, la posición de la estaca en el árbol y la estación del año en que son cortadas. Se ha encontrado también, que cuando las estacas son más viejas, son más difíciles de enraizar. Otro problema ha sido el crecimiento plagiotrópico que muestran algunas varetas.

La emergente biotecnología puede ser otra importante opción para la clonación de especies forestales y otras perennes, considerándose que el cultivo de tejidos vegetales muestra grandes potencialidades para resolver los problemas

Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética,
Colegio de Postgraduados, 56230. Chapingo, Edo.
de México, México.

de la propagación masiva de individuos élite, una vez que entendamos más sobre los procesos organogenéticos.

El presente trabajo muestra los estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, con el objetivo de determinar las mejores condiciones *in vitro* para la micropropagación de *Pinus maximartinezii*.

MATERIALES Y METODOS

FUENTE DE MATERIAL

Las semillas utilizadas en todos los experimentos provienen de polinización abierta y fueron proporcionadas por el Dr. Teobaldo Eguiluz del Depto. de Bosques de la UACH.

GERMINACION

Las semillas fueron puestas a germinar en condiciones asépticas, experimentándose los diferentes métodos:

1. Germinación en medio de cultivo. Se removió la cubierta de la semilla y ésta se desinfectó con alcohol al 70% 1 min., seguido de 10 min en hipoclorito de sodio al 6% para finalmente enjuagarlas tres veces con agua estéril. Las semillas se pusieron en agua solidificada con agar hasta su germinación.
2. Germinación en vermiculita estéril. Las semillas se desinfectaron superficialmente durante 20 min en hipoclorito de sodio conteniendo detergente como humectante, posteriormente se mantuvieron en agua corriente de la llave por 24 h. Fueron desinfectadas nuevamente siguiendo el procedimiento anterior, se pasaron al refrigerador a 4°C durante 48 h para desinfectarse nuevamente durante 20 min en hipoclorito de sodio al 6%. Después las semillas fueron puestas a germinar en vermiculita esterila 27 ± 2°C en obscuridad.
3. Germinación en cajas de Petri. Las semillas se desinfectaron superficialmente (conteniendo la cubierta) durante 20 min en hipoclorito de sodio al 6% posteriormente se rompió la cubierta y se pusieron a germinar en cajas de Petri, con papel filtro húmedo. Los embriones o los cotiledones provenientes de estas semillas fueron inoculados en medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo básico empleado en esta investigación fue el de Schenk y Hilderbrandt (1972). El medio fue suplementado por Benciladepina (BA0 a diferentes concentraciones, 0, 2.5 x 10^{-5}M, 5x10^{5}M, 7.5 x 10^{-5}M.

Para el enraizamiento de los brotes diferenciados se empleó ácido naftalenacético (ANA), 2.68 x 10^{-6} y en combinación con AIB x 10^{-5}.

CONDICIONES FISICAS

Los cotiledones una vez inoculados en el medio de cultivo, fueron mantenidos en un cuarto de ambiente controlado a una temperatura de 27 ± 1°C, con fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 28 ME. cm.^{2} seg. o bien en una cámara a 20°C a luz contínua. Los cultivos fueron observados semanalmente en forma visual o empleando un microscopio estereoscópico a baja magnificación. Paralelo al uso de auxinas en el medio para estimular la formación de raíces, se ensayó el enraizamiento de mezcla de arena y arcilla.

RESULTADOS

La respuesta de los embriones de *P. maximartinezii* a los experimentos llevados a cabo en esta investigación se considerarán continuación.

GERMINACION DE LA SEMILLA EN CONDICIONES ASEPTICAS

La germinación de *P. maximartinezii* en condiciones asépticas mostró serias dificultades, ya que el aumento del desinfectante (hipoclorito de sodio), correlacionó directamente con la pérdida de viabilidad. A mayor concentración de hipoclorito, menor germinación. Cuando se emplearon bajas concentraciones de hipoclorito, (3%), la contaminación de hongos principalmente se incrementó hasta en un 90%. De los métodos experimentales de germinación el que dió mejor resultado fue el de germinación en cajas de Petri. Empleando este método, se logró que las semillas germinaran hasta en un 95%. Sin embargo, fue evidente una gran heterogeneidad en el tiempo de germinación.

RESPUESTAS DE LOS EXPLANTES

Los cotiledones mostraron mayor respuesta morfogenética, comparativamente que cuando se sembraron los embriones completos. Asimismo, los cotiledones respondieron mejor en el medio SH suplementado con BA a la concentración de 2.5 x 10^{-5}M. En términos generales se observó, que los cotiledones en el medio de cultivo sufrían una elongación durante los primeros 7 días de cultivo de aproximadamente el doble de la longitud inicial. Para el día 21 del cultivo, fue evidente la formación del tejido meristemático en diferentes partes de la superficie de los cotiledones y para el día 32 fue posible observar brotes adventicios a partir de este tejido meristemático.

EFECTO DE LA TEMPERATURA

Aproximadamente 70 cotiledones fueron incubados in vitro a una temperatura de 20 + 1°C. Los resultados indicaron que se formó tejido meristemático a los 28 días de incubación. De los cotiledones que formaron tejido meristemático el 90% desarrolló brotes, sin embargo estos fueron evidentes después de los 45 días de incubación. En general, la baja temperatura permitió tener más uniformidad en la respuesta, pero ésta tardó más tiempo en manifestarse.

Los cotiledones que formaron tejido meristemático diferenciaron brotes adventicios. Estos brotes fueron individualizados y se les estimuló para el subsecuente desarrollo. Los brotes de aproximadamente 1 cm fueron transplantados al medio de cultivo con auxinas para promover la rizogénesis. A la fecha, la inducción del sistema radical ha sido muy ineficiente, sin embargo en aquellos brotes que se ha diferenciado la raíz, es evidente una satisfactoria ramificación del sistema radical. Los resultados del enraizamiento en suelo no han mostrado ninguna ventaja superior al enraizamiento in vitro.

DISCUSION

La micropropagación de especies forestales ha sido una importante alternativa para la problemática forestal durante los últimos 10 años (Thorpe, 1983).- Ejemplos de esta aplicación son Pinus radiata, Pseudotsuga menziesii y Abies. Estas herramientas podrán aplicarse en Pinaceas del grupo cembroides una vez que se puedan generalizar los resultados preliminares mostrados en esta investigación. Sin embargo, se estima que en el caso de P. maximartinezii será muy difícil homogeneizar la respuesta in vitro en un alto porcentaje, debido a la heterogeneidad de la semilla. Hemos observado que mientras los cotiledones de un embrión responden morfogenéticamente en forma eficiente, otros mueren rápidamente en las mismas circunstancias. Igual respuesta se ha observado para la inducción del sistema radical. Sin embargo, consideramos que la rizogénesis requiere de mayor estudio.

Un importante problema a resolver ha sido, sin duda, la desinfección de las semillas, sin sacrificar el porcentaje de germinación. En este renglón se ha observado que la heterogeneidad de la semilla juega un importante papel. A la fecha, consideramos haber encontrado un sistema adecuado para tal fin, lo que nos permitirá disponer de material con relativa homogeneidad para ensayar otros experimentos.

Una evaluación del sistema aquí descrito nos permite calificarlo en términos de eficiencia en un 35% para la inducción de los brotes adventicios, Consideramos, sin embargo, que este porcentaje no será incrementado significativamente si no contamos con semillas de procedencia más homogénea.

Por otro lado este 35% en eficiencia nos está permitiendo seleccionar semilla con mayor pótencial morfogénico y que a futuro estaremos homogeneizando nuestra población obenida in vitro. Con respecto a la inducción del sistema radical, consideramos que el potencial para la regeneración de las raíces está presente en los brotes diferenciados in vitro, y que se requiere de más experi

mentación en este objetivo.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue llevado a cabo gracias al apoyo económico proporcionado por el CONACYT, a través del proyecto "Estudio citológico y morfogenético de nueve especies de pinos piñoneros (grupo cembroides) nativos de México" - (ICAFXNA-021284-PE 59).

BIBLIOGRAFIA

Schenk, R.O. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.

Thorpe, T.A. 1983. Biotechnological applications of tissue culture to forest improvement. Biotech Advs. Vol. I, pp. 263-278.

Villalobos A.,V.M., T.A. Thorpe y E.C. Yeung. 1983. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. CONACYT.

Villalobos A.,V.M. y T.A. Thorpe. 1985. La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Fundamentos y Aplicaciones de Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Ed. William Roca, CIAT, Colombia. (En prensa).