

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACION *in vitro* DEL PINON AZUL

Pinus maximartinezii (Rzed.)

POR

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biotecnología

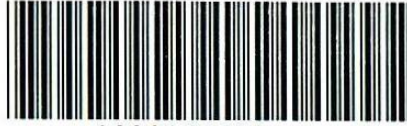
DICIEMBRE DEL 2007

TD
Z5320
FCB
2007
.033

REGENERACION in vitro DEL PINON AZUL
Pinus maximartinezii (Rzed)

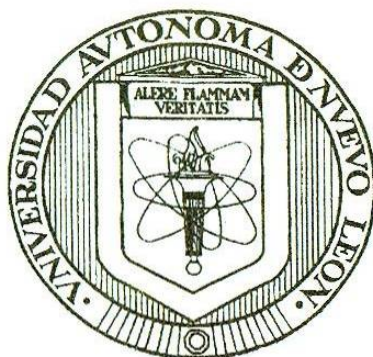
M.C.O.Z

2007



1020160698

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

Por

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Biotecnología

Diciembre de 2007

1464159



TD

ZS320

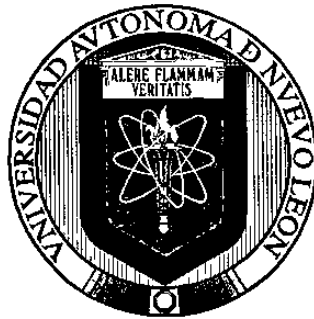
FCE

2007

• O33

4- Septiembre .08
Desarrollo de la ley.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

Por

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Biotecnología**

Diciembre de 2007



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



REGENERACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN AZUL *Pinus maximartinezii* (Rzed)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

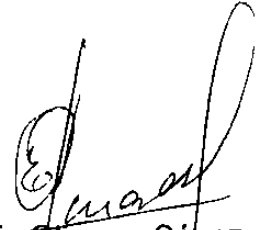
Con Especialidad en Biotecnología

Presenta

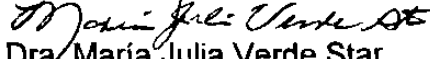
MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS

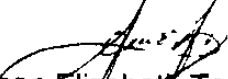
COMISIÓN DE TESIS



Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Director

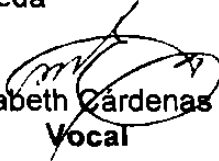

Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Director externo


Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos
Secretario


Dra. María Julia Verde Star
Vocal


Dra. Teresa Elizabeth Torres Cepeda
Vocal


Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal


Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera, intervinieron en la realización de esta investigación.

Al Instituto Tecnológico de Nuevo León por el apoyo otorgado y las facilidades brindadas para la realización de mis estudios doctorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca para la realización del programa doctoral.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, asesor principal, de la presente investigación. Por su confianza y apoyo brindado en la realización de esta investigación, así como su valiosa dirección en el desarrollo del trabajo.

A los siguientes Doctores integrantes de mi comité de tesis, Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos, Dra. María Julia Verde Star, Dra. Teresa Elizabeth Torres Cepeda y Dr. Benito Pereyra Alférez, por su participación en la revisión y sugerencias aportadas al presente trabajo.

Al Dr. Luís Galán Wong por sus sugerencias y apoyo durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A la Dra. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda, por su valiosa dirección en el desarrollo de la presente investigación, además, por su confianza y apoyo siempre brindado, y agradecerle infinitamente haberme compartido sus conocimientos relacionados con el cultivo de tejidos vegetales; los cuales han sido de gran utilidad en el desarrollo de mi vida profesional.

Al Ph.D. Emilio Olivares Sáenz, por la asesoría brindada en la interpretación de los análisis estadísticos de la presente investigación y sus acertadas recomendaciones.

Al M.C. Raúl Porfirio Salazar Sáenz por las facilidades brindadas para la realización del trabajo en el laboratorio a su cargo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Ing Isaac Quintero Quintero por su valiosa colaboración en la donación del germoplasma vegetal, para la realización de esta investigación. Así como, por su disponibilidad en los recorridos de campo al lugar de origen de la especie.

Al M.C. Raúl René Ruíz Garduño, por su colaboración incondicional en la gestión de las visitas y los recorridos de campo al cerro piñones.

DEDICATORIAS

A mis Padres, Margarita Zacarías de Ojeda y Juan Isaías Ojeda Lázaro (†). por su gran amor y comprensión.

A mis Hermanos; Por el apoyo moral, que siempre me han brindado. Así como a todos mis sobrinos por ser la alegría de la familia.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD.....	37
II. Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD.....	38
III. Tratamientos a los que se sometieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de <i>Pinus maximartinezii</i> para estudiar su respuesta <i>in vitro</i> en las diferentes etapas.....	42
IV. Componentes inorgánicos de los medios DCR, GD, MS y SH.....	45
V. Número de yemas promedio de <i>Pinus maximartinezii</i> que presentaron 2 primordios foliares a las seis semanas en la etapa de alargamiento.....	52
VI. Análisis de varianza para la variable número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i>	53
VII. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes obtenidos a las 8 semanas en la triple interacción en <i>Pinus maximartinezii</i>	56
VIII. Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable longitud de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i>	56
IX. Análisis de varianza de la variable capacidad de formación de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas.....	57
X. Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable capacidad de formación de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i>	58
XI. Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces en los medios DCR y GD.....	60
XII. Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de medios de cultivo en cuanto al número de raíces formados en <i>Pinus maximartinezii</i>	60

XIII.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que no formaron raíz, con una raíz y dos raíces con diferentes concentraciones de sales minerales.	61
XIV.	Prueba de Ji-cuadrada para comparación de concentraciones de medios en cuanto al número de raíces formadas en <i>Pinus maximartinezii</i>	61
XV.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que formaron raíz, con una raíz y con dos raíces expuestos a tres tiempos de pulso.....	62
XVI.	Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de tres tiempos de pulso en <i>Pinus maximartinezii</i>	62
XVII.	Análisis de varianza para la comparación de medios de cultivo utilizados para crecimiento de raíz <i>in vitro</i> de <i>Pinus maximartinezii</i>	64
XVIII.	Medias de crecimiento de raíz (mm) de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidas en dos medios de cultivo a las 8 semanas del cultivo <i>in vitro</i>	64
XIX.	Análisis de varianza para la comparación de concentraciones en medios de cultivo en crecimiento de raíz de <i>Pinus maximartinezii in vitro</i>	64
XX.	Medias de crecimiento de raíz (mm) de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidas en dos concentraciones de medios de cultivo a las 8 semanas del cultivo <i>in vitro</i>	65
XXI.	Análisis de varianza para la comparación de tiempos al pulso en cuanto al crecimiento de raíz en <i>Pinus maximartinezii</i>	65
XXII.	Medios de crecimiento de raíz (mm) en tres tiempos de exposición al pulso en <i>Pinus maximartinezii</i>	65

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Material vegetal de <i>Pinus maximartinezii</i>	32
2.	Semillas maduras de <i>Pinus maximartinezii</i> en estratificación.....	32
3.	Proceso de desinfección de las semillas de <i>Pinus maximartinezii</i> ...	35
4.	Obtención de embrión maduro a partir del megagametofito de <i>Pinus maximartinezii</i>	36
5.	Obtención de cotiledones de <i>Pinus maximartinezii</i> a partir de embrión maduro.....	36
6.	Unidades del experimento en condiciones controladas.....	39
7.	Brotos enraizados <i>in vitro</i>	47
8.	Plantas aclimatadas de <i>Pinus maximartinezii</i> después de 8 semanas del establecimiento en esta etapa.....	48
9.	Respuesta observada en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Pinus maximartinezii</i>	50
10.	Formación de estructuras nodulares en embriones cigóticos y cotiledones de <i>Pinns maximartinezii</i> a las 6 semanas de la transferencia <i>in vitro</i>	51
11.	Alargamiento de yemas en embriones cigóticos y cotiledones de <i>pinus maximartinezii</i> a las 2, 4 y 6 semanas de la transferencia en los medios de cultivo.....	52
12.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i> en los medios DCR y GD.....	54

13.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> obtenidos a las 8 semanas de cultivo <i>in vitro</i> en dos concentraciones de BAP.....	55
14.	Proceso de formación de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> a las 8 semanas de cultivo.....	58
15.	Respuesta de los brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> a las 8 semanas en medios de cultivo para promover enraizamiento <i>in vitro</i>	59
16.	Brotes de <i>Pinus maximartinezii</i>	59
17.	Número de brotes de <i>Pinus maximartinezii</i> que formaron raíces en tres tiempos de exposición al pulso.....	63
18.	Brotes con raíces después de 8 semanas en los medios de enraizamiento de <i>Pinus maximartinezii</i>	66
19.	Plántulas de <i>Pinus maximartinezii</i> aclimatadas después de 8 semanas en condiciones controladas y de invernadero.....	67

TABLA DE CONTENIDO

Sección	página
AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCION.....	1
2. IPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivos particulares.....	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Importancia económica de las Pináceas.....	4
4.2 Características de las Pináceas.....	5
4.3 Distribución Geográfica.....	5
4.4 Clasificación Botánica de la Especies.....	6
4.5 Historia y origen del <i>Pinus maximartinezii</i> (Rzedowski).....	7
4.6 Descripción botánica de la especie.....	7
4.7 Importancia económica de la especie en estudio.....	8
4.8 Importancia mundial de la diversidad genética.....	9
4.9 Impacto de la biotecnología vegetal.....	11
4.10 Propagación de las pináceas.....	11
4.11 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales en coníferas.....	12

4.12	Micropropagación en coníferas.....	13
4.13	Factores que influyen en la respuesta <i>in vitro</i>	14
4.13.1.	Luz.....	14
4.13.2	Especie.....	15
4.13.3	Inóculo o explante.....	16
4.13.4	Influencia de la sacarosa en el medio de cultivo.....	17
4.13.5	Medio de cultivo.....	18
4.13.5.1	Efectos de las sales inorgánicas en la respuesta <i>in vitro</i>	18
4.13.5.2	Respuesta a los reguladores de crecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	19
4.13.5.3	Organogénesis en coníferas.....	20
4.13.5.3.1	Etapas de la ruta Organogénética en coníferas...	21
5.	MÉTODOS.....	31
5.1	Material vegetal.....	31
5.1.1	Estratificación de la semilla.....	32
5.1.2	Desinfección de la Semilla.....	33
5.1.3	Desinfección de lo megagametogitos.....	34
5.1.4	Explante o inóculo.....	35
5.2	Medios de cultivo.....	36
5.3	Condiciones controladas del cultivo <i>in vitro</i>	38
5.4	Modelo estadístico.....	39
5.5	Etapas de la organogénesis.....	40
5.5.1	Etapa de establecimiento aséptico.....	40
5.5.2	Etapa de inducción de primordios yemas.....	41
5.5.3	Etapa de alargamiento de yemas.....	42
5.5.4	Etapa de formación de brotes.....	43
5.5.5	Etapa de enraizamiento de brotes.....	44
5.5.5.1	Enraizamiento <i>in vitro</i>	44
5.5.5.2	Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	46

5.5.6 Aclimatación de las plantas.....	48
6. RESULTADOS	49
6.1 Variables evaluadas en la etapas de organogénesis.....	49
6.1.1 Establecimiento aséptico de los explantes.....	49
6.1.2 Inducción de primordios de yemas	50
6.1.3 Alargamiento de yemas	51
6.1.4 Formación de brotes	53
6.1.5 Longitud de brotes.....	55
6.1.6 Capacidad de formación de brotes.....	57
6.1.7 Enraizamiento de brotes	58
6.1.7.1 Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	66
6.1.8 Aclimatación de plantas.....	67
7. DISCUSIÓN.....	68
7.1 Establecimiento aséptico de los explantes.....	68
7.2 Inducción de primordios de yemas.....	68
7.3 Alargamiento de yemas.....	70
7.4 Formación de brotes.....	71
7.5 Longitud de brotes.....	72
7.6 Capacidad de formación de brotes	73
7.7 Enraizamiento de brotes <i>in vitro</i>	73
7.8 Enraizamiento de brotes <i>in vivo</i>	75
7.9 Aclimatación de plantas	75
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	77
LITERATURA CITADA.....	79
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	89

LISTA DE SÍMBOLOS

NOMENCLATURA

----	Sin valor
%	Porcentaje
μM	Micro molar
ABA	Ácido abscísico
atm	Atmósfera
BAP	Bencilaminopurina
B ₅	Tambor <i>et al.</i> , (1965)
CM	Cuadrado medio del error
Cm	Centímetros
°C	Grados centígrados
DCR	Gupta y Durzan (1885)
DOF	Diario Oficial de la Federación
E R	Erison (1965)
F	F- calculada
FV	Fuentes de variación
g	Gramos

g/l	Gramos por litro
GD	Gresshoff y Doy (1972)
GL	Grados de libertad
h	Horas
(H ₂ O ₂)	Peróxido de hidrógeno
Ha	Hectáreas
HE	Hellers (1953)
IBA	Ácido indolbutírico
Kg	Kilogramos
M	Metros
mgl	Miligramos por litro
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Mili molar
mm	Milímetros
MS	Murashige y Skoog (1962)
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NAA	Ácido naftalenacético
NaOCl	Hipoclorito de sodio
SC	Suma de cuadrados
seg	Segundos
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SH	Schenk y Hildebrand (1972)
Sig	Significan cía
SPSS	Statistical Products for Social Sciences
TE	Tang y Ouyang (1999)
Tween-20	Poliexietileno sorbitan monolaurato
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
(v/v)	Volumen sobre volumen
Wh	Whiter (1943)
X^2	Ji- cuadrada

RESUMEN

Pinus maximartinezii (Rzedowski) es una especie endémica de pino en peligro de extinción, confinada a una población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros en una superficie de 400 ha. al sur de Zacatecas, México. El éxito del cultivo de tejidos vegetales para conservación de germoplasma, depende fundamentalmente de la tasa de regeneración. En base a esto se planteó como objetivo desarrollar un protocolo para la micropropagación de *Pinus maximartinezii* mediante la técnica de organogénesis. En la etapa de inducción de yemas fueron cultivados embriones cigóticos y cotiledones en los medios de cultivo DCR y GD adicionados con 0.3 mg l⁻¹ ó 0.5 mg l⁻¹ de BAP; 0.01 mg l⁻¹ de ANA y vitaminas. Los explantes fueron cultivados a 26 °C bajo un fotoperiodo de 16 h. Los explantes fueron transferidos cada 15 días a los mismos medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento durante 6 semanas, para el desarrollo de brotes. El análisis fue un factorial 2³ con 8 repeticiones. La variable evaluada fue el número de explantes que formaron yemas. Después de la inducción de yemas, los explantes fueron transferidos a los medios básicos sin hormonas, adicionados con 0.1 % de carbón activado. Se evaluó el número de brotes por embrión, capacidad de formación de brotes y longitud de brotes a las 8 semanas del cultivo. Se seleccionaron brotes de 10 mm que fueron utilizados en diversos medios de enraizamiento. Se encontró diferencia significativa entre medios de cultivo, concentración de reguladores de crecimiento y capacidad de formación de brotes. La máxima frecuencia de formación de brotes se presentó en el medio DCR adicionado con 0.5 mg l⁻¹ BAP y 0.01 mg l⁻¹ de ANA. La frecuencia más alta de inducción de raíces *in vitro* fue de 17 % en el tratamiento de 24 h de pulso y 23 % con la inoculación de hongos micorrízicos *in vivo*.

Abreviaturas: BAP= Bencilaminopurina; ANA= Acido Naftalenacético; DCR= (Gupta y Durzan 1985); GD= (Gresshoff y Doy, 1972); mg l⁻¹ =miligramos por litro, h =horas.

ABSTRACT

Pinus maximartinezii (Rzedowski) is an endemic species of pine endangered, confined to a single population of approximately 2000 to 2500 mature trees, covers about 400 ha in southern Zacatecas, Mexico. The success of tissue culture techniques for germplasm preservation depends fundamentally on rate of regeneration. The objective of this study was to achieve an *in vitro* proliferation protocol of *Pinus maximartinezii* using organogenesis technique. For bud induction stage, isolated cotyledons and zygotic embryos were cultured on DCR and GD media, supplemented with 0.3 or 0.5 mg l⁻¹ BAP; 0.01 mg l⁻¹ NAA and vitamin solution. Explants were incubated at 26 °C under a 16 h photoperiod. The explants were transferred every 15 days to hormone-free medium (DCR and GD) for a period of 6 wk for development of shoots. The statistical analysis was a factorial 2³ with 8 replications. The parameter evaluated was the number of explants forming buds. After induction of buds, the explants were transferred to hormone-free basal medium to which 0.1% activated charcoal was added. After 8 wk were evaluated the number of shoots per embryo, shoot formation capacity index and length of shoots. Elongated shoots (10 mm length) were exposed to several root initiation media. Basal media, plant growth regulators concentration and shoot formation capacity index were significantly different. The maximum frequency of shoot formation occurred on DCR medium containing 0.5 mg l⁻¹ BAP and 0.01 mg l⁻¹ NAA. The highest root induction frequency was 17% on 24 h pulse treatment and 23 % with *in vivo* mycorrhizal fungi.

Abbreviation: BAP= bencil amino purine; NAA= Naftalen acetic acid; DCR= Gupta & Durzan, 1985; GD= Gresshoft & Doy, 1972; mg l⁻¹= milligrams by liter; h= hours.