

1. INTRODUCCIÓN

México es un País con una gran riqueza forestal y se considera que es centro de origen de las pináceas. El género *Pinus* es el más importante de las coníferas, uno de los centros de diversidad se encuentra en México, con alrededor de 60 especies.

El piñón azul o maxi piñón *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica que ha sobrevivido a una restricción genética extrema y se considera el más raro de los pinos piñoneros ya que está confinado a pequeños rodales de una sola población de aproximadamente 2000 a 2500 árboles maduros que cubren cerca de 400 ha; Se localiza entre 1600 y 2250 m. de altitud sobre una mesa llamada Cerro Piñones la cual está en el extremo sur de la Sierra de Morones en el estado de Zacatecas, México.

La regeneración de la especie es muy escasa o prácticamente inexistente, debido a que las semillas son utilizadas como alimento y la cosecha se realiza cortando las ramas con machete, y esto reduce el número de yemas para futuros brotes por lo tanto, se disminuye su producción natural, además el árbol tiene una corteza muy delgada y es muy susceptible al fuego.

Las coníferas son propagadas tradicionalmente a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. Sin embargo en los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente, puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas tales como la clonación, cultivo de células haploides, formación de embriones somáticos entre otras. Estas técnicas han demostrado ser efectivas en la multiplicación, mejoramiento y conservación de plantas; específicamente juegan un papel muy importante en la conservación de especies en peligro de extinción.

La propagación *in vitro* más utilizada en coníferas es la organogénesis y la embriogénesis somática; en cualquiera de los casos, la regeneración de plantas requiere de varias etapas que deben ser determinadas empíricamente; puesto que existen una serie de factores que influyen para lograr una respuesta exitosa. Entre estos factores se encuentran: Luz, Especie, Tipo de explante, Sacarosa, Medio de cultivo entre otros más.

Por lo anterior, en el presente trabajo se desarrollo un protocolo para la micropropagación masiva *in vitro* de *Pinus maximartinezii*.

En esta etapa de la organogénesis, los explantes se siguen manteniendo en un medio sin reguladores de crecimiento. Generalmente las yemas adventicias formadas son separadas del explante original ya que el crecimiento de los brotes aislados puede ser estimulado por la dilución del medio básico: adición de carbón activado y en ocasiones disminución de sacarosa; (Lu *et al.*, 1991; Harry y Thorpe, 1994; Sen *et al.*, 1994; Saborio, 1996; Capuana, 2001). Por su parte, Zhang *et al.* (2006) mencionan que para la formación de brotes de alta calidad es indispensable la transferencia subsecuente de yemas de *Pinus massoniana* a medios de cultivo con concentraciones más bajas de reguladores de crecimiento.

c) Multiplicación de brotes.

La función de esta etapa es incrementar el número de primordios foliares *in vitro*. La formación de brotes a partir de primordios foliares requiere del subcultivo a otro medio con diferente equilibrio nutritivo y hormonal.

Una vez concluida la fase de alargamiento de yemas, los brotes son subcultivados a medios de cultivo que pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento como BA y Zeatina para probar su habilidad en producir brotes axilares (Lambardi *et al.*, 1993). El número de brotes axilares fue el mejor parámetro para evaluar el efecto de NAA y BA en la proliferación de *Thuja occidentalis*. La multiplicación de brotes fue mejor con 10 μ M BA y 0.1 μ M NAA (Burkhart, 1991). En otra investigación trabajando con *Pinus taeda*, se obtuvo un promedio de 20 brotes/semilla en un periodo de 10 semanas (Niella

y Rocha, 2001). En el caso de *Sequoia sempervirens*, Sul logró establecer en 1995, la proliferación *in vitro* de más de 20 brotes por explante. En un trabajo mas reciente, pero con *Pinus ayacahuite*, se han llegado a formar hasta 50 a 60 brotes/semilla (Saborio, 1996).

d) Enraizamiento.

En angiospermas arbóreas el enraizamiento *in vitro* ha mostrado ser relativamente simple, mientras que en gimnospermas se ha presentado muy problemático (Selby y Seaby, 1982). Aunque la producción de yemas adventicias *in vitro* ha sido exitosa, con frecuencia existe dificultad en el enraizamiento; (Capuana, 2001) logró la multiplicación de brotes de *Pinus cembra* y *Pinus pinea*, sin embargo, el enraizamiento fue difícil de obtener. Por su parte, Mc Keand y Allen (1984) han consignado anomalías en el sistema radical de *Pinus taeda*.

Ocasionalmente los brotes adventicios pueden formar raíces espontáneamente, pero el enraizamiento es mayormente estimulado con la adición de IBA al medio Von Arnold y Ericsson, 1981 o ANA, AIA y BAP (Mott y Amerson, 1981). Se reporta que la auxina que más se utiliza es el IBA en concentraciones de 0.1 a 10 mg l⁻¹; o bien el someter los tejidos a altas concentraciones de auxinas por varias horas (pulso) y en ocasiones la combinación de algunas citocininas (Kin, Zeatina, BAP) a razón de 0.01 - 0.1 mg l⁻¹, benefician la formación de raíces (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe, 2004).

La inducción de raíces se ha obtenido también a través del co-cultivo de los brotes con *Agrobacterium* (Saborío, 1996); y mediante la inoculación con hongos ectomicorrizicos (Oliveira *et al.*, 2003). Generalmente los brotes que alcanzan entre 15 y 30 mm son sometidos a tratamientos de pulso con IBA a razón de 1 μM y 10 μM de NAA (Harry y Thorpe, 1994). Brotes de *Picea rubens* fueron sometidos a un tratamiento de pulso IBA/NAA. 17% de los brotes formaron raíces después del tratamiento con 0.1mM IAA + 0.1 mM IBA por 24h; y solo el 11% se obtuvo con 2.5 mM IBA + 2.5 mM NAA. El tratamiento más efectivo para enraizamiento fue el de 4 h de pulso en 1.0 mM IBA + 10 mM NAA a un pH de 4.5, en el medio GD al 50% de su concentración; sacarosa 1-2% y 0.3% gelrite (Chin Yi *et al.*, 1991).

Por otro lado, Hargreaves *et al.* (2004), aplicaron durante 10 días un tratamiento en el medio GD adicionado con 0.5 mg l^{-1} NAA y 1.0 mg l^{-1} de IBA, a brotes de *Pinus radiata*. Después de 13 a 18 semanas, se obtuvo un promedio de 65 a 74 % de enraizamiento. Posteriormente, estos mismos investigadores (Hargreaves *et al.*, 2005) observaron que en general, los brotes provenientes de cotiledones mostraron una tendencia a tener menos raíces que los provenientes de embrión.

Tang y colaboradores (2004a) han encontrado que la adición de antioxidantes mejora el enraizamiento de brotes de *Pinus virginiana* en una proporción de 19 %. Estos investigadores concluyeron que los antioxidantes redujeron e inhibieron la oxidación y la necrosis, al reducir la acumulación de peroxidasa.

c) Aclimatación

El estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia de las plántulas obtenidas *in vitro*; por lo que se recomienda, hacer uso de un invernadero o una cámara de crecimiento adecuado para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva bajo condiciones *ex vitro* (Pierik, 1990a).

La técnica *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las plantas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Nairn (1992), consignó un enraizamiento *ex vitro* entre 5 a 85 % en *Pinus radiata*.

En 1982 Selby y Seaby observaron que plántulas de *Pinus contorta* desarrollaron un gran número de raíces laterales primarias en un sustrato humedecido con auxinas. Lo que disminuyó así, la inestabilidad de las plántulas transplantadas. En *Pinus halepensis* los brotes utilizados en la etapa de enraizamiento, fueron transferidos directamente a macetas que contenían mezcla de turba y vermiculita en proporciones de 1:1 y regados con agua corriente. Las macetas se mantuvieron con una humedad relativa de 70% por 3 a 4 semanas y después transferidos al invernadero (Lambardi *et al.*, 1993). Para *Pinus radiata*, Hargreaves *et al.* (2005) han transferido los brotes a charolas conteniendo una

mezcla de 1:1:1 de turba, perlita y arena. Los brotes se mantuvieron bajo condiciones de luz y temperatura similares a aquellos que crecieron *in vitro*; después de una semana los brotes fueron gradualmente endurecidos para llevarlos a condiciones de humedad ambiental ($60 \pm 10\%$), al transcurrir cuatro semanas del establecimiento los brotes fueron monitoreados y sembrados en charolas plásticas con la misma mezcla utilizada anteriormente; con la adición de 5g l^{-1} de osmocote y transferidas al invernadero por un lapso de 8 semanas.

5. MÉTODOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de Febrero de 2004 a Julio de 2007.

5.1 Material vegetal.

Pinus maximartinezii (Rzedowski) es una especie endémica en peligro de extinción que únicamente se desarrolla en estado natural en el “cerro de piñones”; se encuentra en grupos o de manera aislada con individuos de porte variable que no superan los 12 metros de altura, en el municipio de Juchipila, Zacatecas; México. (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002). Semillas maduras de *Pinus maximartinezii* fueron colectadas de árboles seleccionados en su hábitat natural en octubre y noviembre del 2003 (Figura 1).



Figura 1. Material vegetal de *Pinus maximartinezii*. A, conos en desarrollo; B, cono maduro; C, Semillas maduras.

5.1.1 Estratificación de la semilla.

Con la finalidad de eliminar los agentes contaminantes, las semillas fueron cepilladas y lavadas con detergente en agua corriente durante 5 min y posteriormente, fueron colocadas en una mezcla estéril de perlita y arena (1:1) y colocadas a 5 °C por 40 días (Figura 2).



Figura 2. Semillas maduras de *Pinus maximartinezii* en estratificación.

5.1.2 Desinfección de la semilla.

La asepsia de los inóculos utilizados es imprescindible para el éxito en cultivo de tejidos vegetales. La mayoría de las especies presentan contaminantes superficiales o incluso patógenos endógenos que, de no eliminarse, provocan la pérdida total de los explantes.

Por lo expuesto anteriormente y con el objeto de eliminar los contaminantes superficiales, las semillas intactas previamente estratificadas se sometieron a un proceso de predesinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6% de ingrediente activo (Cloralex)^{MR} adicionado con 2 g de detergente comercial. En esta solución las semillas permanecieron 5 min. Posteriormente, las semillas fueron cepilladas nuevamente y enjuagadas con agua corriente permaneciendo por un lapso de 24h en estas condiciones (Figura 3a).

Una vez concluida la predesinfección, se seleccionaron únicamente semillas que presentaban dimensiones uniformes, siendo en promedio de 2.0 a 2.5 cm de largo; procediéndose a eliminar las testas, utilizando un martillo para romperlas y extrayendo el megagametofito intacto, para ser utilizado en el establecimiento *in vitro* (Figura 3b).

5.1.3 Desinfección de los megagametofitos.

La desinfección se realiza con la finalidad de evitar las contaminaciones con microorganismos, esto es un aspecto básico que se debe considerar para el éxito del establecimiento *in vitro* de los inóculos y de todas las etapas siguientes de los explantes.

El proceso de desinfección se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar (Alder^{MR}), los megagametofitos fueron colocadas por 45 min en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 12.5 volúmenes y en agitación continua. Con el propósito de eliminar el exceso de agente desinfectante, el material fue sometido a tres enjuagues con agua esterilizada.

Después los megagametofitos se transfirieron a etanol al 70% (v/v) durante 1 min realizándose un enjuague con agua esterilizada durante 5 min y en agitación. Posteriormente los megagametofitos se colocaron durante 5 min en una solución al 15% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (6% de ingrediente activo); adicionado con 0.5 ml de poliexietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) seguido de 3 enjuagues con agua esterilizada por 5, 10 y 15 min respectivamente y en agitación (Figura 3c).



Figura 3 Proceso de desinfección de las semillas de *Pinus maximartinezii*. A, Predesinfección de la semilla; B, Escarificación de la semilla; C, Desinfección de los megagametofitos; D, Megagametofitos asépticos.

5.1.4 Explante o inóculo

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta. La elección de un explante apropiado contribuye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski 1991).

En el presente estudio se utilizaron como fuente de inóculo dos tipos de explante: cotiledones disectados de embriones maduros y embriones cigóticos obtenidos de megagametofitos (Figura 3d).

El proceso de extracción de los explantes se realizó utilizando pinza y bisturí en la campana de flujo laminar sobre cajas petri esterilizadas (Figura 4 y 5).

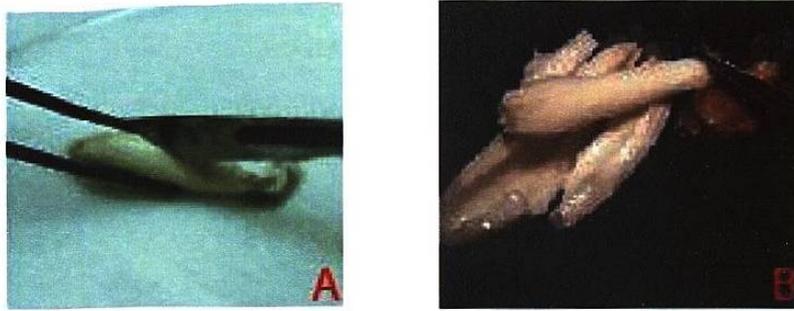


Figura 4. Obtención de embrión maduro a partir del megagametofito de *Pinus maximartinezii*. A, Megagametofito maduro completo; B, Extracción del embrión maduro.

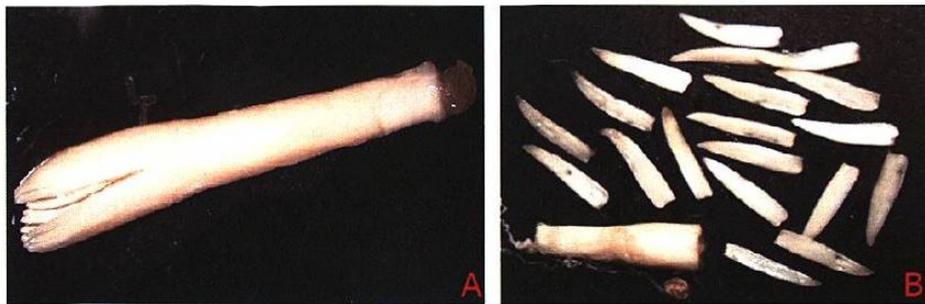


Figura 5. Obtención de cotiledones de *Pinus maximartinezii* a partir de embrión maduro. A, Embrión maduro; B, Cotiledones disectados.

5.2 Medios de cultivo.

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio de cultivo apropiado, donde hay que considerar no sólo sus componentes sino, su preparación. En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante y sustancias reguladoras de crecimiento entre otros compuestos.

Los medios seleccionados para el cultivo *in vitro* de esta especie fueron DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972). para las primeras etapas de desarrollo del cultivo (TABLA I). A continuación se enlistan los componentes inorgánicos de ambos medios de cultivo para 1000 ml de medio.

TABLA I
Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD.

Nutrientos (mg l ⁻¹)	Medio DCR	Medio GD
NH ₄ NO ₃	400.00	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	200.00
KN ₃	340.00	1000.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00	250.00
KH ₂ PO ₄	170.00	-----
CaCl ₂ 2H ₂ O	85.00	150.00
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556.00	-----
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	-----	300.00
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-----	56.30
KI	0.83	0.75
KCl	-----	90.00
H ₃ BO ₃	6.20	3.00
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	10.00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60	3.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.0025	-----
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	27.80
Na ₂ EDTA	37.30	37.30

Los componentes inorgánicos anteriormente señalados constituyen los medios de cultivo básicos. Sin embargo es indispensable la adición de componentes orgánicos en los medios de cultivo como los enlistados en (TABLA II).

TABLA II

Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD.

Vitaminas mg l ⁻¹	DCR	GD
Tiamina HCl	1.0	1.0
Glicina	2.0	---
Piridoxina-HCl	5.0	0.1
Glutamina	50.0	---
Ácido Nicotínico	5.0	0.1
Inositol	200.0	10.0
Caseína hidrolizada	500.0	---
Ácido abscísico	10.0	10.0
Bencilaminopurina	0.3	0.3
Bencilaminopurina	0.5	0.5
Ácido indolbutírico	10.0	10.0
Ácido naftalenacético	0.01	0.01

Una vez adicionados ambos componentes, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH y HCL al 1N a 5.7 y aforado a 1000 ml el medio fue suplementado con 0.5% de agar-gel (5gl⁻¹) como agente gelificante; pasándose a fundir en horno microondas por 7 min. Los medios de cultivo se dosificaron en frascos de vidrio de alimento infantil, con 25 ml de medio por unidad experimental. Estos fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C de temperatura y 1 atmósfera de presión por 15 min.

5.3 Condiciones controladas del cultivo *in vitro*.

En general es necesario disponer de una cámara de cultivo donde se pueda controlar la luz y temperatura principalmente.

Las unidades del experimento permanecieron 6 semanas en condiciones controlados de fotoperiodo de 6h-luz a 100 μmol.m².S⁻¹ y temperatura de 26 °C (Figura 6).



Figura 6. Unidades del experimento en condiciones controladas de *Pinus maximartinezii*.

5.4. Modelo estadístico.

El modelo estadístico utilizado para este experimento fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2^3 , donde el factor A son los explantes, el factor B son los medios de cultivo y factor C son las concentraciones a los reguladores de crecimiento, con 8 repeticiones por tratamiento, siendo un total de 8 tratamientos. El modelo fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial el cual se expresa como: $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$. Los resultados fueron analizados a través de análisis de varianza utilizando el programa estadístico SPSS.

5.5 Etapas de la organogénesis.

El proceso morfológico de la organogénesis implica la formación de estructuras unipolares como raíces y tallos el cual en coníferas se lleva a cabo en diversas etapas con la adición de diferentes reguladores de crecimiento (Tang *et al.*, 2004 b). Por su parte, Bergmann (1992), reporta que el éxito en un sistema organogénico determinado no es garantía para asegurar una respuesta favorable en otra especie.

5.5.1 Etapa de establecimiento aséptico

Lo que se pretende obtener en esta etapa es establecer cultivos viables. El éxito de esta etapa está determinado por la edad de la planta donadora, por su estado fisiológico y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la desinfección de los explantes (Pierik, 1990).

El material utilizado como fuente inicial de explantes corresponde a embriones cigóticos y cotiledones obtenidos de semillas maduras ambos fueron previamente desinfectados asépticamente y sembrados en posición horizontal con la finalidad de que todos los explantes estuvieran en contacto con los medios de cultivo DCR y GD, adicionados con BAP a razón de 0.3 y 0.5mg l^{-1} además con 0.01mg l^{-1} de NAA (Figura 3). Posteriormente las unidades experimentales fueron selladas y colocadas en un cuarto de incubación, bajo condiciones controladas con un fotoperiodo de 16hr-luz a 100 $\mu\text{mol.m}^2.\text{S}^{-1}$ a una temperatura de 26 °C. Después de 10 días del establecimiento

aséptico se evaluó el porcentaje de supervivencia y el porcentaje de contaminación de los explantes *in vitro*.

5.5.2 Etapa de inducción de primordios de yemas.

La función de esta etapa es incrementar el número de propágulos en cultivo *in vitro* (Hartmann y Kester, 1999). Para esta etapa de desarrollo del experimento, los explantes fueron transferidos a medio nuevo. Posteriormente las unidades experimentales fueron selladas y colocadas nuevamente en incubación, bajo las mismas condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. Una vez transcurridas 6 semanas, los explantes fueron evaluados. Se procedió a efectuar observaciones morfológicas en los tratamientos. La variable evaluada fue el porcentaje de explantes viables, mediante una prueba estadística no paramétrica de X^2 .

A continuación se muestran los tratamientos a los que fueron sometidos los explantes para estudiar su respuesta *in vitro* (TABLA III).

TABLA III

Tratamientos a los que se sometieron cotiledones y embriones cigóticos maduros de *Pinus maximartinezii* para estudiar su respuesta *in vitro* en las diferentes etapas.

Factor A Explante	Factor B Medio de cultivo	Factor C Concentración de reguladores de crecimiento mg l ⁻¹	Número de tratamiento
Cotiledones	DCR	0.3	1
		0.5	2
	GD	0.3	3
		0.5	4
Embrión	DCR	0.3	5
		0.5	6
	GD	0.3	7
		0.5	8

Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2³; donde el factor A: Explantes; factor B: Medios de cultivo; factor C: Concentración de los reguladores de crecimiento.

5.5.3 Etapa de alargamiento de yemas

Una vez concluida la etapa de inducción de yemas es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Harry y Thorpe, 1994).

Con la finalidad de favorecer el alargamiento de yemas, en ésta etapa, los cotiledones y embriones fueron transferidos a los medios DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972), eliminando los reguladores de crecimiento y disminuyendo la sacarosa a la mitad de su concentración. Este procedimiento se repitió

cada 15 días. En estas condiciones, los explantes permanecieron por seis semanas en el cuarto de incubación en las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que la etapa anterior. La variable evaluada fue el número de yemas que presentaban al menos 2 primordios foliares bien desarrollados.

5.5.4 Etapa de formación de brotes.

La función de esta etapa es incrementar el número de primordios foliares *in vitro*. Los brotes son subcultivados sobre medios de cultivo que pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento para probar su habilidad de producir brotes. (Lambardi *et al.*, 1993).

Con la finalidad de evaluar el número de brotes así como la longitud de los mismos los explantes con yemas desarrolladas se transfirieron a los mismos medios de cultivo de la etapa anterior pero ahora adicionados con 0.1% de carbón activado manteniéndose en el cuarto de incubación durante 8 semanas.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar el índice de capacidad de formación de brotes, para determinar la eficiencia de los tratamientos se evaluó el porcentaje y promedio de explantes que presentaron respuesta. Utilizando la siguiente fórmula:

$$CBF = \frac{(\text{No. Promedio de brotes por Explante}) (\% \text{ de explantes que formaron brotes})}{100}$$

según la metodología utilizada por Lambardi *et al.*, (1993). Los efectos principales de explantes, medios de cultivo y concentraciones se estudiaron con un análisis de varianza

utilizando las interacciones de primero y segundo orden como estimadores del error experimental.

5.5.5 Etapa de enraizamiento de brotes.

El enraizamiento de brotes en angiospermas ha mostrado ser relativamente simple, mientras que en las gimnospermas se ha presentado mayor problema (Thorpe, 2004).

5.5.5.1 Enraizamiento *in vitro*.

En esta etapa de la organogénesis se establecieron tres experimentos, para el primero, los brotes fueron disectados de los explantes y sometidos a un tratamiento por 16h en una solución conteniendo 1.0 mg l^{-1} de IBA y 0.5 mg l^{-1} de ANA a un pH 4.5. Los brotes tratados fueron colocados en tres medios de cultivo (DCR, GD, MS), al 50 % de su concentración original de sales minerales y sacarosa en estado líquido y sólido (TABLA IV).

Las unidades experimentales se transfirieron al cuarto de incubación en condiciones controladas de fotoperiodo de 16h-luz a $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ con una temperatura de $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por ocho semanas. La variable evaluada fue el número de brotes con raíz.

TABLA IV

Componentes inorgánicos de los medios DCR, GD, MS y SH.

Nutrientos (mg ^l ⁻¹)	Medio DCR	Medio GD	Medio MS	Medio SH
NH ₄ NO ₃	400.0	-----	1650.00	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	200.00	-----	-----
KN0 ₃	340.00	1000.00	1900.00	2500.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00	250.00	370.00	400.00
KH ₂ PO ₄	170.00	-----	170.00	-----
CaCl ₂ 2H ₂ O	85.00	150.00	440.00	200.00
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556.00	-----	-----	-----
NaH ₂ PO ₄ 7H ₂ O	-----	300.00	-----	-----
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	-----	56.30	-----	-----
KI	0.83	0.75	0.83	1.00
KCl	-----	90.00	-----	-----
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	6.20	5.00
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	10.00	-----	10.00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60	3.00	8.60	1.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.10
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	0.25	0.025	0.20
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25	0.025	0.10
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.0025	-----	-----	-----
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	27.80	27.80	15.00
NaEDTA	37.30	37.30	-----	-----
Na ₂ . EDTA	-----	-----	37.30	300.00
MnSO ₄ 4H ₂ O	-----	-----	22.00	20.00
Sacarosa	30000.00	20000.00	30000.00	30000.00
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

Para esta etapa fue establecido un segundo experimento donde se utilizaron tres medios de cultivo modificados (TABLA IV). Al 75, 50 y 25 % de su concentración original de sales minerales y disminuyendo la sacarosa al 50%. Los brotes fueron sometidos asépticamente a un proceso de pulso el cual consistió en colocarlos en cada medio de cultivo (en estado líquido) adicionado con 10 mg^l⁻¹ de IBA por un lapso de 72 h. Posteriormente se transfirieron por ocho semanas a los mismos medios de cultivo solidificados. La variable evaluada fue el número de brotes que presentaron raíces. El

diseño fue un completamente al azar con arreglo factorial 3^3 con 8 repeticiones por tratamiento.

Un tercer experimento consistió en utilizar brotes mayores de 1.0 cm de altura que fueron colocados en un tratamiento de pulso de 1.0 mM de IBA a diferentes tiempos de exposición: 6, 12 y 24 h; posteriormente fueron colocados en los medios (DCR y GD) al 100% y al 50% de concentración de las sales minerales, sin reguladores de crecimiento, con la mitad de la concentración de la sacarosa y 1.0 y 0.5 % de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por ocho semanas en el cuarto de incubación. Los tratamientos fueron establecidos al azar, regidos por un factorial 2^3 , con 8 repeticiones por tratamiento, donde la variable evaluada fue número de plantas con raíz y número de raíces por planta.

5.5.5.2 Enraizamiento de brotes *in vivo*.

La técnica *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente ya que ocasionalmente se forma callo en la base de las plantas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Diversos estudios han demostrado el potencial de usar hongos micorrízicos para la propagación vegetativa. Además la inoculación puede incrementar la habilidad de las plántulas para contrarrestar el estrés producido por la transferencia *ex vitro*. De modo que ciertos factores puedan actuar de manera sinérgica lo que puede llevar a respuestas positivas en los genotipos que sean compatibles con los hongos (Niem. *et al.*, 2004).

En ésta etapa fueron utilizados brotes de 3.0 cm de altura, los cuales se sometieron a un tratamiento con Benlate a razón de 150 mg l^{-1} por 30 minutos. (Figura 7 a, b). Posteriormente se colocaron por separado en un sustrato 1:1:1 de peat moss, perlita y arena de río (Figura 7c). Cada brote fue regado con una solución esterilizada al 0.2 gl^{-1} de Raizal^{MR} y cubierto con bolsa de plástico (Figura 7d).

Se establecieron 30 unidades experimentales en condiciones controladas de luz y temperatura, evaluándose el número de plantas con raíces después de 4 semanas.

Se estableció un segundo experimento, inoculando con esporas de micorrizas (*Ectomycorrhiza*) a razón de 1.0 mg l^{-1} adicionado con una gota de jabón líquido por cada 150 ml de agua.

Las unidades fueron establecidas en las mismas condiciones que el experimento anterior; estableciéndose 30 unidades experimentales. La variable evaluada a las 4 semanas fue el número de brotes que presentaron raíz.

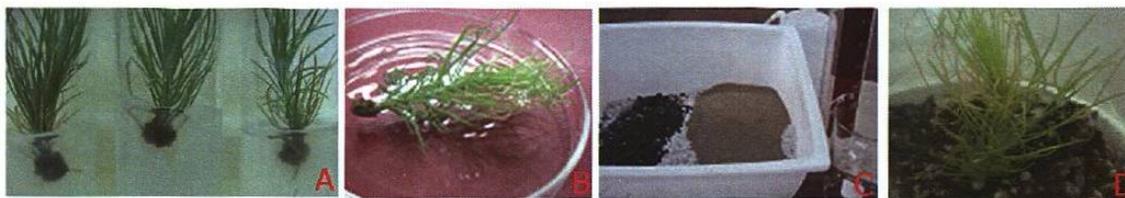


Figura 7. Brotes enraizados *in vivo* de *Pinus maximartinezii*. A, Brotes mayores de 3 cm de altura; B, Brote con la base lavada; C, Sustrato en proporción de 1:1:1; D, Brote cubierto con plástico.

5.5.6 Aclimatación de las plantas.

Para favorecer la aclimatación de las plantas es necesario llevar a cabo el proceso gradualmente, puesto que la inestabilidad de las plantas transplantadas es debido en parte, a la falta de raíces primarias; así como a la incidencia de malformaciones en el sistema radicular. (Selby y Seaby, 1982).

Con el propósito de lograr la aclimatación, las plantas enraizadas fueron transferidas a macetas que contenían sustrato de peat moss, perlita y arena de río en proporción de 1:1:1 (Figura 8 a, b). Las unidades experimentales se regaron con agua bidestilada. Todas las macetas fueron cubiertas por 4 semanas con bolsas de plástico transparente para mantener la humedad relativa alta. (Figura 8c).

Posteriormente las macetas permanecieron en condiciones de invernadero por dos semanas; gradualmente, las bolsas plásticas fueron perforadas hasta que se eliminaron por completo. Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de supervivencia y número de plantas aclimatadas (Figura 8d).



Figura 8. Plantas aclimatadas de *Pinus maximartinezii* después de 8 semanas del establecimiento en esta etapa. A, Planta con raíz; B, Planta establecida *in vivo*; C, Plantas a las 4 semanas; D, Planta a las 8 semanas.

6. RESULTADOS

6.1 Variables evaluadas en las etapas de organogénesis.

Los resultados de las variables en estudio, fueron transformados calculando la raíz cuadrada para ser utilizados en los análisis de varianza y asegurar una distribución normal (Snedecor y Cochran, 1971).

6.1.1 Establecimiento aséptico de los explantes.

A los 10 días del establecimiento *in vitro*, se determinó un 0 % de contaminación y 100% de supervivencia para todos los tratamientos del experimento en ambos explantes (Figura 9).

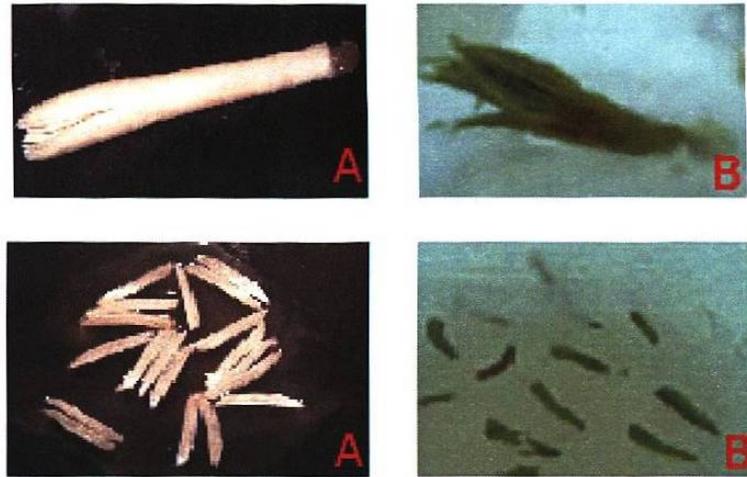


Figura 9. Respuesta observada en el establecimiento *in vitro* de *Pinus maximartinezii*. A, Establecimiento aséptico de los explantes; B, Respuesta de los explantes a los 10 días.

6.1.2 Inducción de primordios de yemas

Los embriones cigóticos y cotiledones utilizados en esta etapa presentaron cambios morfológicos que se hicieron evidentes desde los primeros 5 días de iniciado el cultivo. Ambos explantes evidenciaron cambios en la tonalidad de un color crema inicial a un verde claro; posteriormente la tonalidad verde se volvió más intensa y con pigmentos púrpura, iniciándose el proceso de dediferenciación.

A las 6 semanas de iniciado el cultivo, en ambos explantes se observó la formación de estructuras nodulares similares a callos con primordios de yemas presentes. El análisis de varianza para esta etapa no detectó diferencias significativas entre los tres factores estudiados. Se puede observar la respuesta obtenida en la Figura 10 donde se muestran cambios cualitativos en la morfología de los explantes. La prueba no

paramétrica no presentó diferencia significativa para tratamientos, puesto que el 100% de los explantes mostraron respuesta.

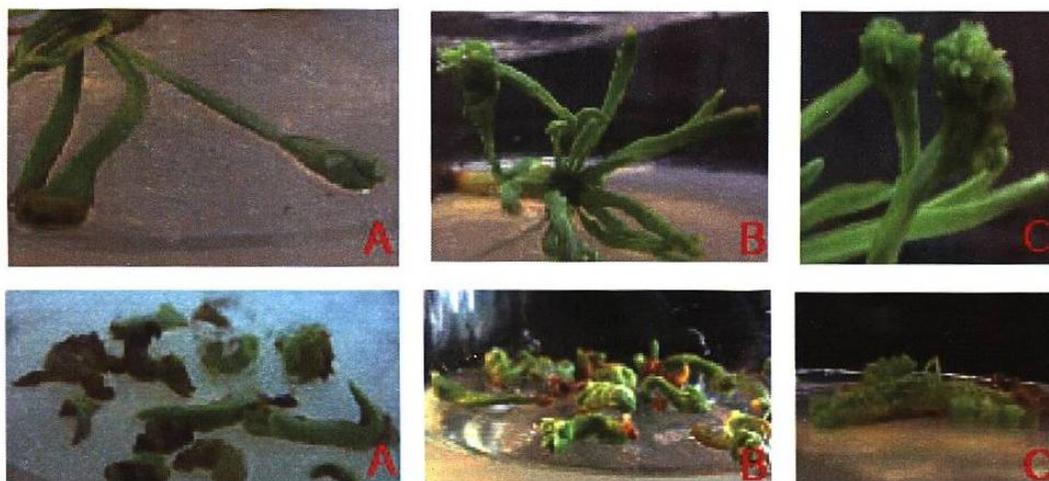


Figura 10. Formación de estructuras nodulares en embriones cigóticos y cotiledones de *Pinus maximartinezii* a las 6 semanas después de la transferencia *in vitro*. A, Desdiferenciación de los explantes *in vitro*; B, Respuesta a las 3 semanas del establecimiento *in vitro*; C, Respuesta a las 6 semanas del establecimiento *in vitro*.

6.1.3 Alargamiento de yemas

El análisis de varianza no presentó diferencias significativas para ningún factor en esta variable. La comparación de medias a las seis semanas del cultivo se muestra en la (TABLA V).

160698

TABLA V

Número de yemas promedio de *Pinus maximartinezii* que presentaban 2 primordios foliares a las seis semanas en la etapa de alargamiento.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
1.093a	1.375a	1.312a	1.156a	1.281a	1.187a

Literales diferentes dentro de cada factor indican diferencias significativas entre los niveles ($P=0.05$).

Sin embargo, la Figura 11 muestra la respuesta obtenida en ambos explantes.

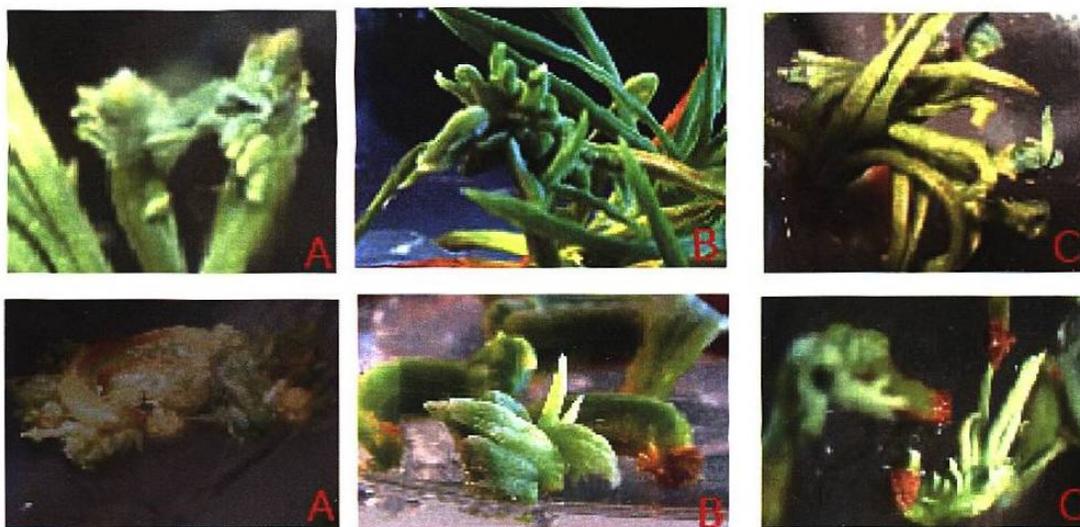


Figura 11. Alargamiento de yemas en embriones cigóticos y cotiledones de *Pinus maximartinezii* a las 2, 4 y 6 semanas de la transferencia en los medios de cultivo. A, Explantes con yemas a las 2 semanas de la transferencia; B, Yemas a las 4 semanas de la transferencia; C, Elongación de yemas a las 6 semanas de la transferencia.

6.1.4 Formación de brotes

Con respecto a la variable número de brotes, el análisis de varianza mostró diferencia significativa para medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento (TABLA VI).

TABLA VI

Análisis de varianza para la variable número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

	FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante	(E)	0.563	1	0.563	0.174	0.678
Medio	(M)	22.563	1	22.563	6.981	0.011 *
Concentración	(C)	14.063	1	14.063	4.351	0.042*
E x M		1.000	1	1.000	0.309	0.580
E x C		0.250	1	0.250	0.077	0.782
M x C		0.250	1	0.250	0.077	0.782
E x M x C		6.250E-02	1	6.250E-02	0.019	0.890
Error		181.000	56	3.232		
Total		219.750	63			

*Diferencia significativa

Así mismo, la comparación de medias mostró diferencia estadística para medios de cultivo presentando un mayor número de brotes en el medio DCR (4.031), comparado con el GD donde se encontraron (2.844) en promedio (Figura 12).

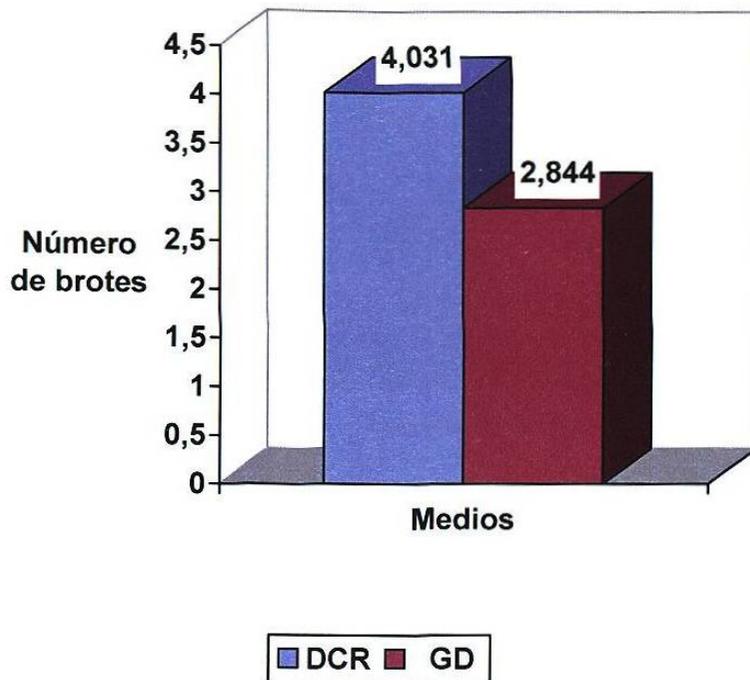


Figura 12. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro* en los medios DCR Y GD.

La comparación de medias para concentraciones de reguladores de crecimiento, mostró diferencia significativa ($p=0.042$); presentando un mayor número de brotes con 0.5 mg l^{-1} de BAP (3.906), comparado con la concentración de 0.3 mg l^{-1} donde se obtuvieron 2.969 en promedio (Figura 13).

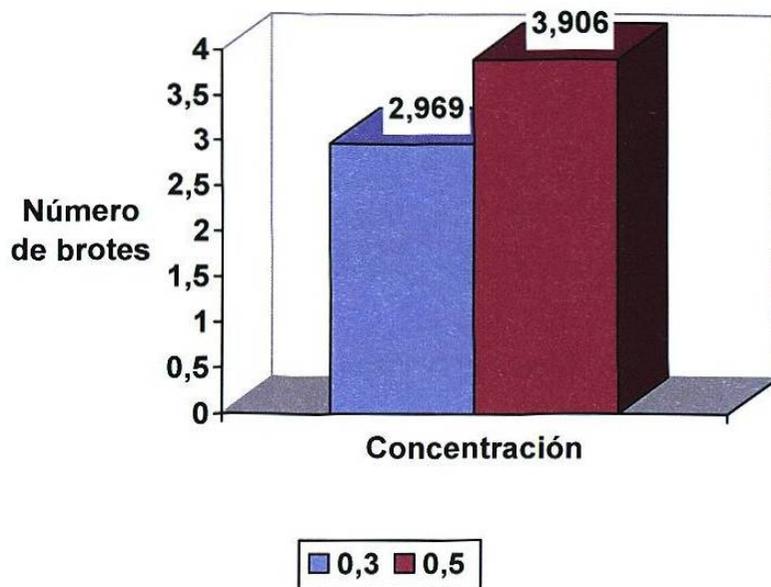


Figura 13. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas de cultivo *in vitro* en dos concentraciones de BAP.

6.1.5 Longitud de brotes

Otra de las respuestas de interés en el cultivo *in vitro*, que se asocia con el crecimiento y desarrollo del explante, es la longitud de brotes. El análisis de varianza de esta variable se muestra en la (TABLA VII).

TABLA VII

Análisis de varianza para la variable longitud de brotes obtenidos a las 8 semanas en la triple interacción en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante (E)	0.281	1	0.281	1.459	0.239
Medio (M)	1.531	1	1.531	7.946	0.010
Concentración (C)	2.000	1	2.000	10.378	0.004
E x M	0.125	1	0.125	0.649	0.429
E x C	2.531	1	2.531	13.135	0.001
M x C	0.781	1	0.781	4.054	0.055
E x M x C	8.000	1	8.000	41.514	0.000
Error	4.625	24	0.193		
Total	19.875	31			

El análisis de varianza mostró diferencia significativa en la triple interacción por lo que se procedió a realizar la comparación de medias en cotiledones y embriones (TABLA VIII).

TABLA VIII

Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable longitud de brotes de *Pinus maximartinezii*.

Explante	Medio	Concentración	Longitud de brote en cm.
Cotiledones	DCR	0.3	2.25 a
Cotiledones	DCR	0.5	1.0 b
Cotiledones	GD	0.3	1.25 b
Cotiledones	GD	0.5	2.625a
Embrión	DCR	0.3	1.5 b
Embrión	DCR	0.5	1.125b
Embrión	GD	0.3	2.75 a
Embrión	GD	0.5	1.0 b

Cuando se utilizaron los cotiledones como explante, se presentó mayor longitud con el medio DCR a concentración de 0.3 mg^l⁻¹ y para el medio GD se presentó con 0.5

mg l⁻¹. Al utilizar el embrión como explante, la mayor longitud se observó en el medio GD con 0.3 mg l⁻¹.

6.1.6 Capacidad de formación de brotes

Con la finalidad de tener mediciones cuantitativas objetivas que puedan ser utilizadas para seleccionar los mejores tratamientos, se evaluó el índice de capacidad de formación de brotes. El análisis de varianza se muestra en la (TABLA IX).

TABLA IX

Análisis de varianza de la variable capacidad de formación de brotes de *Pinus maximartinezii* obtenidos a las 8 semanas.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante	20.225	1	20.225	249.381	0.000 *
Medio	0.442	1	0.442	5.448	0.080
Concentración	0.336	1	0.336	4.145	0.111
Error	0.324	4	8.110E-02		
Total	21.327	7			

* Diferencia significativa

La comparación de medias para el factor explante muestra que el embrión fue superior a los cotiledones. En cuanto al medio de cultivo, el DCR presentó mayor respuesta que el GD (TABLA X).

TABLA X

Promedios obtenidos a las 8 semanas en la variable capacidad de formación de brotes de *Pinus maximartinezii*.

Explante		Medio de Cultivo		Concentración de reguladores de crecimiento mg l^{-1}	
Cotiledones	Embrión	DCR	GD	0.3	0.5
0.520a	3.700b	2.345a	1.875b*	1.905a	2.315a

Literales diferentes dentro de cada factor indican diferencias significativas entre los niveles ($P=0.05$). * Significativa al 0.08 de probabilidad.

En la Figura 14, se muestra el proceso de formación de brotes en ambos explantes; se consideraron solo aquellos que mostraban al menos dos primordios foliares bien desarrollados.

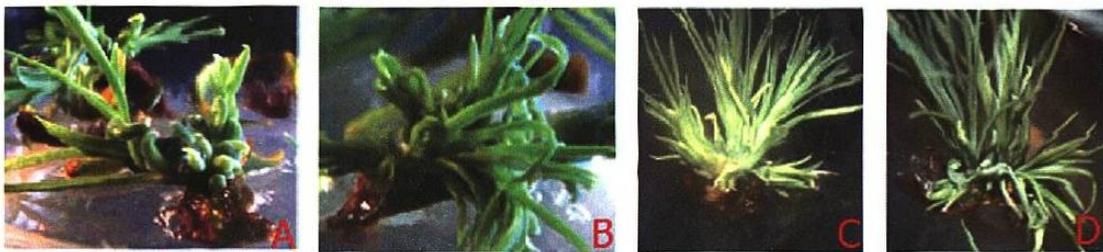


Figura 14. Proceso de formación de brotes de *Pinus maximartinezii* a las 8 semanas de cultivo. A, Explantes con primordios foliares; B, Formación de brotes en desarrollo; C, Brotes diferenciados a partir de embrión cigótico; D, Brotes diferenciados a partir de cotiledones.

6.1.7 Enraizamiento de brotes

En los brotes establecidos en los tratamientos del primer experimento, después de 8 semanas de cultivo *in vitro*, no fue posible analizar los datos estadísticamente puesto que los explantes que se mantuvieron tanto en medio líquido como sólido, se oxidaron hasta llegar a la senescencia total del brote (Figura 15a).



Figura 15. Respuesta de los brotes de *Pinus maximartinezii* a las 8 semanas en medios de cultivo para promover enraizamiento *in vitro*. A, Respuesta de los explantes en medio sólido; B, Respuesta de los explantes en medio líquido.

En el segundo experimento los brotes establecidos tendieron a formar callo en la base pero continuaron su crecimiento y no existió oxidación ni senescencia, estos brotes fueron utilizados para tratamientos, posteriores de enraizamiento *in vivo* (Figura 16).



Figura 16. Brotes de *Pinus maximartinezii*.

Con respecto al tercer experimento, los resultados fueron evaluados y se compararon los medios en cuanto a la formación de raíz; se realizó un análisis de Ji-cuadrada con la información de la TABLA XI, en donde se observa que la mayoría de los brotes no formaron raíces. La prueba de Ji-Cuadrada mostró que no hubo diferencia significativa entre los medios en cuanto al número de raíces formadas (TABLA XII).

TABLA XI

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces en los medios DCR y GD.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
MEDIO	DCR	38	8	2	48
	GD	41	6	1	48
Total		79	14	3	96

TABLA XII

Prueba de Ji-Cuadrada para la comparación de medios de cultivo en cuanto al número de raíces formadas en *pinus maximartinezii*.

	Valor	Gl	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	0.733	2	0.693

Por otro lado, se determinó que la concentración de los medios de cultivo no contribuyó en mejorar el enraizamiento. La concentración con el 100% de las sales minerales presentó un total de 5 brotes con una raíz y un brote con dos raíces, mientras que la concentración con la mitad de las sales minerales presentó 9 brotes con formación de una raíz y dos con dos raíces (TABLA XIII). La prueba de Ji-cuadrada mostró que no hubo diferencia significativa ($p=0.408$) entre las 2 concentraciones en cuanto al número de brotes que formaron raíz (TABLA XIV).

TABLA XIII

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces con diferentes concentraciones de sales minerales.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
Concentración	100%	42	5	1	48
	50%	37	9	2	48
Total		79	14	3	96

TABLA XIV

Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de concentración de medios en cuanto al número de raíces formadas en *Pinus maximartinezii*.

	Valor	Gl	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	1.793	2	0.408

En el experimento correspondiente a los tiempos de pulso, únicamente 3 brotes formaron una raíz en los tiempos de 6h y 12h; sin embargo, el tratamiento de 24h presentó 8 brotes con una raíz y 3 con dos raíces (TABLA XV). Encontrándose diferencias significativas en la prueba de Ji. Cuadrada con ($p= 0.024$) entre los tres tiempos de pulso en cuanto al número de brotes con formación de raíces (TABLA XVI). Esto indica que el tiempo de pulso puede ser un factor importante en la diferenciación de raíces.

TABLA XV

Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que no formaron raíz, con una raíz y con dos raíces expuestos a tres tiempos de pulso.

		Sin raíz	Con una raíz	Con dos raíces	Total
TIEMPO	6 h	29	3	0	32
	12 h	29	3	0	32
	24 h	21	8	3	32
Total		79	14	3	96

TABLA XVI

Prueba de Ji-cuadrada para la comparación de tres tiempos de pulso en cuanto al número de raíces formadas en *Pinus maximartinezii*.

	Valor	Gl	Sig.
Ji-Cuadrada de Pearson	11.192	4	0.024

En la Figura 17 se muestra la mejor respuesta en cuanto a los tiempos de pulso a los que fueron sometidos los brotes.

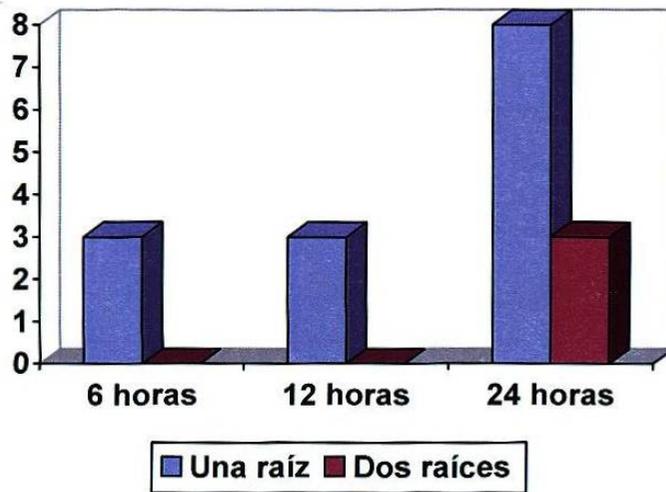


Figura 17. Número de brotes de *Pinus maximartinezii* que formaron raíces en tres tiempos de exposición al pulso.

A las ocho semanas se midió longitud y el número de raíces en las unidades experimentales en donde se manifestó formación de raíz. Con esta información se obtuvo el crecimiento promedio de raíces a las ocho semanas. Esta variable se utilizó para comparar los niveles de los factores estudiados (medios, concentraciones y tiempos) utilizando un análisis de varianza, con la finalidad de evaluar el efecto de estos factores sobre el crecimiento de raíces.

En cuanto a la comparación de los medios de cultivo, se encontró que no hubo diferencias significativas entre éstos para el crecimiento promedio de raíces (TABLAS XVII y XVIII).

TABLA XVII

Análisis de varianza para la comparación de medios de cultivo utilizados para crecimiento de raíz *in vitro* en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Medio	3.661	1	3.661	0.820	0.379
Error	66.957	15	4.464		
Total	70.618	16			

TABLA XVIII

Medias de crecimiento de raíz (mm) de *Pinus maximartinezii* obtenidas en dos medios de cultivo a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

Medio	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
DCR	7.700	0.668	6.276	9.124
GD	8.643	0.799	6.941	10.345

De igual manera las concentraciones de los medios de cultivo no tuvieron influencia en el crecimiento de raíz, como se observa en (TABLAS XIX y XX).

TABLA XIX

Análisis de varianza para la comparación de concentraciones de medios de cultivo en cuanto al crecimiento de raíz de *Pinus maximartinezii in vitro*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Concentraciones	1.061	1	1.061	0.229	0.639
Error	69.55	15	4.637		
Total	70.61	16			

TABLA XX

Medias de crecimiento de raíz (mm) de *Pinus maximartinezii* obtenidas en dos concentraciones de medios de cultivo a las 8 semanas de cultivo *in vitro*.

Concentración	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
100%	7.750	0.879	5.876	9.624
50%	8.273	0.649	6.889	9.657

Los tiempos al pulso no mostraron diferencias significativas para el crecimiento de raíz (TABLAS XX I y XXII).

TABLA XXI

Análisis de varianza para la comparación de tiempos al pulso en cuanto al crecimiento de raíz en *Pinus maximartinezii*.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tiempo	7.375	2	3.688	0.816	0.462
Error	63.242	14	4.517		
Total	70.618	16			

TABLA XXII

Medias de crecimiento de raíz (mm) en tres tiempos de exposición al pulso en *Pinus maximartinezii*.

Tiempo	Media	Error Estándar	95% Intervalo de confianza	
			Limite inferior	Limite superior
6 horas	8.333	1.227	5.701	10.965
12 horas	6.667	1.227	4.035	9.299
24 horas	8.409	0.641	7.035	9.784

La Figura 18 muestra brotes que formaron raíces después de ocho semanas de permanecer en condiciones de cultivo *in vitro*.

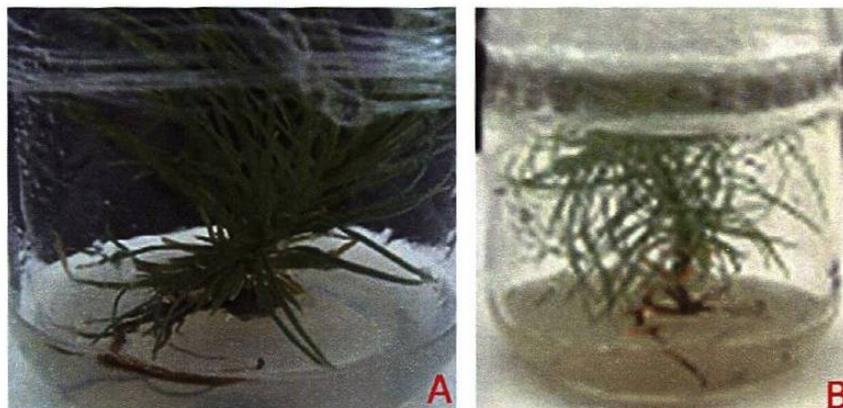


Figura 18. Brotes con raíces después de 8 semanas en los medios de enraizamiento en *Pinus maximartinezii*. A, Brotes con raíz en el medio DCR; B, Brotes con raíz en el medio GD.

6.1.7.1 Enraizamiento de brotes *in vivo*.

Después de 4 semanas en el sustrato 1:1:1 de peat moss, perlita y arena de río, los brotes presentaron 13.33 % de enraizamiento; 20.01 % no formaron raíces; afectando también el que 66.66 % de los brotes presentaran problemas de marchitamiento (damping-off).

Por otro lado, en los resultados del experimento donde adicionalmente se inocularon esporas micorrízicas; 23.33 % de los brotes formaron raíces; 43.34 % no diferenciaron raíz y 33.33 % presentaron damping-off.

6.1.8 Aclimatación de plantas

Con los sustratos utilizados se logró obtener el 50% de plantas aclimatadas. En el porcentaje restante se presentaron problemas de marchitamiento. La figura 19 muestra la secuencia del proceso de aclimatación.



Figura 19. Plántulas de *Pinus maximartinezii* aclimatadas después de 8 semanas en condiciones controladas y de invernadero. A, Plántula para la aclimatación; B, Plántula con raíz lavada; C, Plántula con humedad relativa controlada; D, Plántulas aclimatadas a las 8 semanas.

2. HIPÓTESIS

De acuerdo al medio de cultivo *Pinus maximartinezii* presenta diferente potencial de regeneración *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la micropropagación de *Pinus maximartinezii* que permita su preservación *in vitro*

3.2 Objetivos particulares

Determinar el medio de cultivo más apropiado, para cada una de las etapas de la micropropagación.

Definir la dosis óptima del regulador de crecimiento que promueve la máxima multiplicación de brotes *in vitro*.

4 ANTECEDENTES

4.1 Importancia económica de las pináceas

Los bosques son muy importantes en la economía mundial para el mantenimiento y preservación de nuevos ecosistemas (Altman, 2003). La productividad de las plantaciones forestales es esencial para satisfacer las demandas de productos maderables y así preservar las poblaciones naturales y la biodiversidad (Nehra, 2005).

Generalmente, las pináceas constituyen la principal fuente de materia prima en productos maderables; los cuales desempeñan una fuente importante de empleo en las comunidades rurales y urbanas. Sin embargo, los usos domésticos presentan un factor destructivo, ya que son utilizados como combustible, cercos, vigas, etc. Por otra parte, las semillas son utilizadas como alimento para el hombre y la fauna silvestre (Escoto, 1988).

Para disminuir el incremento en la demanda de los bosques ya existentes, es necesario un esfuerzo global para incluir las especies forestales en la era moderna del fitomejoramiento; por lo que, los programas de mejoramiento de árboles deben combinar las técnicas más sofisticadas de biología molecular y las tradicionales, junto con una eficiente propagación clonal a gran escala, constituyen elementos clave para el

manejo y reforestación exitosa de bosques comerciales (Altman, 2003). Por lo anterior es importante desarrollar programas relacionados con la conservación de este recurso natural.

4.2 Características de las pináceas.

Son árboles o arbustos de tallo leñoso monopódico y ramificado, con hojas pequeñas alternas, opuestas o verticiladas, comúnmente aciculares o escuamiformes y aveceoladas. Las flores femeninas y masculinas forman por lo regular zonas aisladas o en grupos. Sus frutos son por lo común conos con escamas lignificadas o carnosas. Las semillas tienen alas, pero muchas pináceas carecen de ellas. La raíz carece de pelos absorbentes; en sustitución de los mismos se desarrollan hongos que las envuelven y forman micorrizas, las cuales desempeñan el papel de los pelos radicales. Su corteza está más o menos suberificada, en la mayoría de ellas existen canales resiníferos. Por lo general, son plantas perennes, están renovando constantemente sus hojas (Rzedowski, 1978).

4.3 Distribución geográfica.

Las pináceas tienen en la flora mexicana enorme importancia desde el punto de vista forestal. Una gran mayoría se localiza en lugares montañosos, templados y fríos, solamente pocas especies se desarrollan en lugares subtropicales. La familia de las pináceas comprende en México 8 géneros:

1. *Pinus*, con 38 especies, 10 variables y 16 formas
2. *Picea*, con 2 especies
3. *Pseudotsuga*, con 4 especies y una variable
4. *Abies*, con 8 especies y 5 variables
5. *Taxodium*, con una especie
6. *Libocedrus*, con una especie
7. *Cupressus*, con 6 especies y 2 formas
8. *Juniperus*, con 12 especies, 6 variables y 3 formas

El género *Pinus* es el de más amplia distribución (Martínez, 1963). Habita principalmente en zonas templadas y frías aunque también se encuentra en las altas mesetas y montañas de algunas zonas tropicales; se puede desarrollar desde el nivel del mar hasta 4000 m de altura (Rzedowski, 1978).

4.4 Clasificación botánica de la especie.

Reino: Vegetal

División: Embryophyta Siphonogama

Subdivisión: Gymnospermae

Orden: Coniferae

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Especie: *maximartinezii*

(Lawrence, 1971).

4.5 Historia y origen del *Pinus maximartinezii* (Rzedowski).

Hace 42 años se dió a conocer como una especie nueva (Rzedowski, 1964), después de que fue identificada a raíz de que su semilla se comercializaba como un producto local en el mercado de Juchipila. Zacatecas.

Hoy en día se tienen 5 reportes sobre la variación genética (Delgado, 2002; SEMARNAT, 2003). También sobre acciones de conservación, mejora genética, obtención de semillas, ubicación de especies amenazadas (Vargas, 2003) y sobre la composición natural de las semillas (Mata 2001a). Es una especie que está considerada como endémica y ha sobrevivido a una restricción genética extrema (Ledig *et al.*, 1999). Catalogada en peligro de extinción por la legislación ambiental mexicana (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002).

4.6 Descripción botánica de la especie.

Pinus maximartinezii, son árboles de 5 a 10 m de altura y de 15 a 25 cm de diámetro. No obstante se puede encontrar hasta de 20 m de altura y 60 cm de diámetro. Esta especie presenta ramificaciones múltiples, es raro que se presente dominancia monoatómica en alguna parte apical. Los tallos cuando son arbustos son lisos de color grisáceo, cambiando luego con el tiempo a grisáceo-cafesoso. Las ramas son largas, delgadas y flexibles de color verde grisáceo. Las hojas se disponen en fascículos de cinco, son delgadas y flexibles de 8 a 10 cm de largo y de 0.3 a 0.6 mm de ancho, distribuidas al final de las ramas, presentan estomas en la parte ventral, la parte dorsal

presenta un color verde brillante de 6 a 8 mm dispuestas en rosetas. El color es cambiante, varía dependiendo de la época del año; presenta desde el color grisáceo y el color azulado en diferentes tonalidades. Los conos son simétricos, miden en promedio de 18 a 22 cm de largo y de 10 a 15 cm de ancho cuando están abiertos. Un cono verde llega a medir hasta 35 cm de largo y pesar hasta 2 kg. Las semillas miden de 20 a 25 mm de largo y 10 a 12 mm de ancho, son oblongas y color café brillante; el embrión se encuentra encerrado por el gametofito y la testa la cual es dura y tiene un espesor de 1.5 mm (Ling y Leung, 2003). El endospermo es de color blanco con 18 a 24 cotiledones y son comestibles (Martínez, 1963).

4.7 Importancia económica de la especie en estudio.

El Piñón azul o maxi Piñón *Pinus maximartinezii* (Rzedowski) es una especie endémica (NOM-059-ECOL-2001; DOF, 2002) en peligro de extinción que ha sobrevivido a una restricción genética extrema y se considera el más raro de los pinos piñoneros ya que está confinada a una sola población de aprox. 2000 a 2500 árboles maduros (Ledig, 1999), su distribución se limita dentro de un área que apenas rebasa las 2.800 ha y al parecer nunca se ha extendido más de sus límites actuales (López, 1998), se localiza entre 1.110 a 2.500 msnm. Su ubicación geográfica se encuentra en los paralelos 21°19' y 21°23' de latitud norte y entre los meridianos 103°12' y 103°14' de longitud oeste; por sus características biogeográficas a este polígono llamado Cerro Piñones de 2.800 ha se le denomina ecosistema del *Pinus maximartinezii*. Rzed; está en el extremo sur de Sierra Morones en el Estado de Zacatecas México (Ruíz *et al.*, 2006).

La regeneración de la especie es muy escasa o prácticamente inexistente, debido a que las semillas son utilizadas como alimento y la cosecha se realiza cortando las ramas con machete y esto reduce el número de yemas para futuros brotes por lo tanto, se disminuye su reproducción natural (Ledig, 1999). Así mismo, los incendios forestales y el sobre pastoreo, fueron los factores que en cierta medida contribuyeron a disminuir el tamaño de la población del bosque. Esta especie tiene potencial para ser utilizada como planta de ornato, como árbol de navidad, para reforestación de áreas urbanas y recreativas, los conos tienen mucha aceptación en la industria del regalo y decoración en temporadas navideñas (Quintero, 1996).

4.8 Importancia mundial de la diversidad genética.

El mantenimiento de la diversidad genética se ha convertido en un problema de importancia mundial debido a la deforestación, contaminación y los cambios climáticos. Es por esto, que la mayoría de los mejoradores, hacen énfasis en la importancia del mantenimiento de la variabilidad genética, ya que una disminución en la diversidad o la pérdida de una especie podrían dañar severamente el ecosistema y reduciría las posibilidades de tener una fuente natural para el mejoramiento futuro de otras especies. El incremento en la demanda por productos maderables y la reducción de bosques disponibles ha llevado recientemente a la introducción de varias herramientas moleculares y biotecnológicas para investigar y mejorar este recurso (Grout, 1995; Altman, 2003).

Aunque la conservación del hábitat será siempre lo más crítico en el mantenimiento del máximo nivel de diversidad vegetal, las técnicas *in vitro* pueden proveer métodos alternativos para propagar y conservar tejidos de plantas amenazadas o en peligro de extinción (Pence, 1991; Fay, 1994; Charls y Pence, 2004). A esta categoría pertenece *Pinus maximartinezii* que está catalogada como una especie endémica y en peligro de extinción debido al tamaño restringido de su población (Ledig, 1999), por lo que, la micropropagación y la caracterización molecular se han convertido en una herramienta muy importante para la supervivencia de las especies amenazadas con la extinción y constituyen una alternativa para la preservación de las mismas (Maruyama *et al.*, 2006). Sin embargo las técnicas deben ser adaptadas en cada una de las especies que permanecen todavía sin ser estudiadas (Hargreaves *et al.*, 2005).

La identificación de los recursos genéticos es solamente una parte del trabajo, una vez que se han identificado, los recursos deben ser conservados y aunque el almacenamiento de semillas es el método más común para la mayoría de las especies, es un hecho que no todas las especies pueden ser almacenadas como semilla ya que algunas permanecen viables solamente unas pocas semanas a un año. Las semillas de coníferas pueden ser almacenadas por décadas pero eventualmente este material necesita ser renovado a partir de nuevos árboles. Este proceso de producir semilla nueva es caro y durante la selección puede modificarse el recurso genético (Ledig, 1988; Grout, 1995). Por lo tanto, el desarrollar un protocolo para el entendimiento de cómo se lleva a cabo un crecimiento organizado en las plantas, es muy importante para utilizar la biotecnología en aplicaciones prácticas (Thorpe, 2004).

4.9 Impacto de biotecnología vegetal.

La biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que más desarrollo ha demostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. La biotecnología es una práctica que junto con el mejoramiento tradicional utiliza los descubrimientos básicos en el campo de cultivo de tejidos vegetales para la clonación, transferencia de genes, biología molecular y genómica (Altman, 2003; Nehra *et al.*, 2005). Estas disciplinas son sin duda una herramienta invaluable para incrementar tanto la cantidad como la calidad de los alimentos de origen vegetal.

4.10 Propagación de las pináceas.

Tradicionalmente las Pináceas son propagadas a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. El largo período de crecimiento desde semilla a floración varía de 15 a 20 años, provocando grandes obstáculos para el mejoramiento tradicional (Go *et al.*, 1993). Así mismo, la propagación vegetativa presenta una serie de problemas ya que la capacidad de enraizamiento es baja. Ante este panorama, la técnica de cultivo de tejidos vegetales representa una posible solución para los problemas forestales. En los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas que pueden llegar a sustituir los métodos de propagación vegetativa tradicional (Lambardi *et al.*, 1993). Mediante ésta técnica, se ha logrado propagar más de 50 especies del género *Pinus*,

utilizando embriones cigóticos como fuente de inóculo (Thorpe, 1990). Los inóculos (explantes) son multiplicados *in vitro* rápidamente y esto resulta en la producción de plantas que muchas veces alcanzan varios miles después de un año (Hargreaves *et al.*, 2002). Por lo tanto, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta muy importante en los programas de especies amenazadas con la extinción (Mata *et al.*, 2001b) debido a la versatilidad de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* (Capuana, 2001).

4.11 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales en coníferas.

Desde finales de los setentas se han hecho evidentes las contribuciones por parte de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales en la agricultura y la industria (Murashige, 1978; Pierik, 1990b). Salvaguardar los recursos genéticos continúa siendo una de las aplicaciones más importantes (Capuana, 2001), ya que puede ser muy útil para la rápida propagación clonal de genotipos superiores en un periodo más corto (Chesik, 1991). Se reporta que, el mejoramiento genético en coníferas es por lo general difícil debido a los largos periodos previos a la floración. Además la polinización es cruzada, lo que dificulta la selección de árboles con características superiores (Saborío, 1996; Saborío *et al.*, 1997).

La primera gimnosperma regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Pinus palustris* a partir de embriones (Sommer *et al.*, 1975). Con posterioridad a estas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de 57 especies maderables por sistemas similares; donde se ha logrado la formación de

plantas completas *in vitro* (Mott, 1981; Thorpe *et al.*, 1990; Prehn *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006).

4.12 Micropropagación en coníferas.

El uso más extensivo del cultivo de tejidos vegetales ha sido la micropropagación: el cual es un término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*; el cual consiste en propagar un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. Esta es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniformes a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Pierik, 1990 a).

La micropropagación es una alternativa que ha sido usada eficientemente en la propagación de coníferas. Esta técnica permite acelerar la selección, el mejoramiento y los periodos de prueba de las especies prometedoras; favoreciendo así la multiplicación de genotipos superiores identificados en campo (Anderson e Ievinsh, 2002 a y b). Es también un método complementario para los bancos de germoplasma; las modernas técnicas de ADN recombinante, en combinación con la micropropagación podrían crear una rápida modificación del genoma de las coníferas (Saborio, 1996). lo que llevaría a acelerar el proceso de domesticación a través de la selección y propagación de árboles élite en programas de mejoramiento (Nehra *et al.*, 2005). La versatilidad de los diferentes sistemas de propagación *in vitro* de especies forestales incluyen:

multiplicación de brotes axilares, organogénesis y embriogénesis somática (Capuana, 2001; Altman, 2003).

Los sistemas de propagación *in vitro* más utilizados en coníferas son la organogénesis y la embriogénesis somática (Lambardi *et al.*, 1993); en cualquiera de los casos, la regeneración de plantas requiere de varias etapas que deben ser determinadas empíricamente; puesto que existen una serie de factores que influyen para lograr una respuesta exitosa (Thorpe, 2004; Lelu-Walter *et al.*, 2006).

4.13 Factores que influyen en la respuesta *in vitro*.

Los factores físicos ambientales influyen grandemente en el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Entre los principales factores a considerar en la propagación de coníferas se encuentran: luz, especie, tipo de explante, medio de cultivo y sacarosa entre otros (Pierik, 1990 a y b; Thorpe, 1994).

4.13.1 Luz

La luz es uno de los factores físicos más importantes para el desarrollo *in vitro*. Tanto la duración (fotoperiodo) como la calidad (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que al influir en la síntesis y acumulación de ciertas sustancias, como las hormonas endógenas y el almidón, afectan el desarrollo del inóculo (Barba, 2001).

En *Pinus radiata* se comprobó que en los primeros 21 días del cultivo, es necesaria la luz para la formación óptima de brotes (Villalobos *et al.*, 1985). Trabajando con la misma especie Moller y colaboradores (2006) encontraron que la luz provocó un efecto estimulante en la diferenciación de los elementos vasculares y la actividad de enzimas relacionadas con el proceso de diferenciación en cultivo de callo. La actividad de las enzimas L fenilalanina amonio-liasa y cinamil alcohol-deshidrogenasa fue más alta con 16 h de fotoperiodo que los cultivos que crecieron en oscuridad.

Por otro lado, se ha comprobado que la ausencia de luz es necesaria para que se lleve a cabo la inducción de primordios de raíces en el género *Pinus* (Villalobos *et al.*, 1983).

4.13.2 Especie.

En los últimos años se ha trabajado con diversas coníferas; aunque las plántulas han sido regeneradas a partir de varias especies, una propagación masiva redituable ha sido establecida solamente para un número limitado de éstas Sen *et al.*, (1994), ya que algunas son consideradas como especies recalcitrantes (Charbonneau, 2004).

Por otro lado, para lograr desarrollar un sistema de micropropagación en coníferas, es necesario adaptar un protocolo modelo ya establecido y modificarlo, para cada especie en particular Jong y Tainer (1991); puesto que el éxito con un sistema organogénico determinado no es garantía para asegurar una respuesta favorable en otra especie (Bergmann, 1992). Los resultados obtenidos por Park y colaboradores (2006),

demuestran que los efectos del genotipo tuvieron una gran influencia sobre la respuesta *in vitro*. Por su parte, Bonson y Dixon, proponen en 1991 un protocolo para la propagación de *Pinus elliotti* utilizando cotiledones pueden producir mas de 100 plantas por embrión.

4.13.3 Inóculo o explante.

Otro de los factores más críticos para la propagación de coníferas es el explante (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987); debido a que varios tejidos de la misma planta en diversos estadios de desarrollo, difieren en su respuesta cuando son cultivados *in vitro*.

En gran número de especies se han utilizado como explante embriones cigóticos maduros e inmaduros, cotiledones, yemas, acículas y meristemas apicales (Reilly y Washer, 1977; Tautorus *et al.*, 1991; Niella y Rocha, 2001; Prehn *et al.*, 2003; Sul y Korban, 2004).

En 1994, Harry y Thorpe obtuvieron exitosamente la inducción de yemas y brotes utilizando embriones completos de *Pinus banksiana* Lamb. Así mismo, Sen y colaboradores (1994), así como Niella y Rocha (2001), reportan la inducción de brotes *in vitro* a partir de cotiledones de embriones cigóticos. Por su parte, trabajando con embriones cigóticos de *Pinus radiata*, Hargreaves *et al.*, (2005), menciona que mediante la técnica de multiplicación de brotes axilares es posible llegar a producir varios miles de plantas después de un año en cultivo *in vitro*. Así mismo, Ojeda (1996), utilizando

por su parte, cotiledones de embriones maduros con diferentes concentraciones y tipos de citocininas, obtuvo la regeneración de *Pinus cembroides* y *P. halepensis*.

Sin embargo, Kulchetski *et al.*, (1993) trabajando con explantes cotiledonares en *Abies amabilis*, usando el medio de Shenck y Hildebrand (1972), suplementado con 10 μ M de BA, no obtuvieron una propagación *in vitro* exitosa. Así mismo, Tampe, (1996) estudiando la respuesta *in vitro* de cotiledones de *Pinus radiata* a diferentes concentraciones de ácido jasmónico, observó que este regulador inhibió el proceso de organogénesis.

4.13.4 Influencia de la sacarosa en el medio de cultivo.

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto, es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% al 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede remplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa. En general la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Roca y Mroginski, 1991; Merino, 1988; Pierik, 1990a)

En coníferas se utiliza un rango que oscila entre 2 a 3% de sacarosa: por ejemplo Hargreaves *et al.*, (2004) utilizó una concentración de sacarosa del 2% en el medio GD, para la regeneración de brote de *Pinus radiata*. En otro experimento con *Picea chihuahuana* la han utilizado a razón de 3% como fuente de carbono en el medio de SH, para la inducción de brotes (Mata *et al.*, 2001b). Así mismo, se ha utilizado con éxito en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* a razón de 2 y 3%, en la inducción y alargamiento

de yemas así como en la multiplicación de brotes (Ojeda, 1996). En otras especies de pinos las concentraciones óptimas de sacarosa varían entre 0.5 y 2% (Halos y Go, 1993)

4.13.5 Medio de cultivo.

En la propagación *in vitro* de Pináceas regularmente se han utilizado medios en donde varía la concentración de sales orgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento, tipo de agente gelificante, pH, concentración de sacarosa y agentes antioxidantes (Tautorus, 1991; Tang *et al.*, 2004c). por lo que, existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan con frecuencia en la micropropagación de coníferas: MS (Murashige y Skoog, 1962), DCR (Gupta y Durzan, 1985), GD (Gresshoff y Doy, 1972), SH (Schenck e Hildebrand, 1972), B₅ (Gamborg *et al.*, 1965), ER (Ericsson, 1965), HE (Heller's, 1953), Wh (White, 1943), TE (Tang y Ouyang, 1999). Según se menciona éstas fórmulas generalmente recibieron su nombre del investigador que las dio a conocer a la ciencia (Roca y Mroginski, 1991; Tang *et al.*, 2004 b).

4.13.5.1 Efectos de las sales inorgánicas en la respuesta *in vitro*

Para crecer, las células requieren de nutrientes orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Generalmente los nutrientes inorgánicos se clasifican como macro y micronutrientes; y son utilizados para elaborar las formulaciones o medios de cultivo básicos (Pierik, 1990a; Roca y Mroginski, 1991). En diversos estudios se compararon 5 formulaciones de sales inorgánicas para inducción de yemas en *Picea*

rubens. Lu y colaboradores (1991) encontraron que tanto el tipo como la concentración del medio básico son importantes para la fase de inducción. Así mismo, Ojeda (1996), al comparar el medio DCR contra el GD reportó una diferencia significativa en el desarrollo de brotes en *Pinus cembroides* y *P. halepensis*, observando una mayor respuesta en la formación de brotes en el medio DCR en ambas especies en comparación con el GD. En *Pinus strobus*; se comparó la capacidad de formación de brotes con el medio SH al 100% de su concentración (Flinn *et al.*, 1985). Por su parte, (Mata *et al.*, 2001b), utilizando el mismo medio al 50% de su concentración original y sin reguladores de crecimiento obtuvieron la inducción de brotes adventicios en *Picea chihuahuana*.

4.13.5.2 Respuesta a los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

El éxito en la propagación *in vitro* es obtenida por la estimulación de los explantes en cultivo. Esto por lo general se logra a través de los reguladores de crecimiento incluidos en el medio. Generalmente, tanto las auxinas como las citocininas son necesarias para el cultivo de brotes *in vitro* de coníferas (Atree y Fowke, 1991; Roca y Mroginski, 1991). Por ejemplo, en *Pinus massoniana* las yemas adventicias se diferenciaron de embriones cigóticos cultivados en el medio DCR adicionado con 0.5 mg l⁻¹ de BA y 0.05 mg l⁻¹ del AIB (Zhang *et al.*, 2006).

En experimentos con *Pinus halepensis* fue estudiada la respuesta de diferentes citocininas como BA, Cinetina, 2ip y Zeatina sobre la inducción de yemas adventicias; todas las citocininas fueron aplicadas a razón de (1.0, 2.5, 5.0 y 10 µM). La mejor

citocinina resultó ser BA (Lambardi *et al.*, 1993). Por otro lado, Mata *et al.*, (2001b), estudiaron la respuesta de BA y Kin sola o conjuntamente con ANA y 2.4.D. Los brotes adventicios fueron obtenidos principalmente de la región cotiledonar a partir de una amplia gama de concentraciones de reguladores de crecimiento; la cinetina fue más eficaz que BA en la inducción de brotes en *Picea chihuahuana*, a diferencia de lo observado por Lambardi *et al.*, (1993). Durante el proceso de formación de brotes, se producen cambios fisiológicos y bioquímicos en los tejidos. Se considera en general, que las citocininas promueven la formación *in vitro* de centros meristemáticos que llevan a la diferenciación posterior de yemas y brotes (Hiriart, 1991; Winkler, 1995).

Investigaciones previas en pinos (Renfoe y Berlyn, 1985), han demostrado que los niveles de citocininas usados para la inducción adventicia, puede provocar la síntesis de altos niveles de ADN. Se han estudiado los cambios metabólicos provocados por la adición de BA a cotiledones de *Pinus* y se ha concluido que para la formación de brotes se requirió de un incremento en la producción de ácidos nucleicos (Moncalean *et al.*, 2006; Stasolla *et al.*, 2007).

4.13.5.3 Organogénesis en coníferas.

La organogénesis es uno de los sistemas de propagación *in vitro* más utilizado en coníferas, el cual comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos (Roca y Mroginski, 1991; Lambardi *et al.*, 1993; Schestibratov *et al.*, 2003). Se ha consignado la estimulación de yemas

adventicias por medio de organogénesis: siendo este uno de los sistemas de propagación *in vitro* que ha tenido mucho éxito (Thorpe y Biondi, 1984; Capuana, 2001).

La organogénesis indirecta, puede obtenerse a partir de callo, controlando la iniciación de un primordio por medio de la manipulación de los nutrientes y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Por lo tanto, las plántulas regeneradas a partir de un cultivo de callo pueden mostrar variabilidad (Narayanaswamy, 1977; Patel y Berlyn, 1982). Mediante ésta técnica se han obtenido brotes de *Pinus radiata* y *Pinus virginiana* respectivamente (Schestibratov *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004c). De igual manera, se ha establecido un protocolo de micropropagación eficiente de *Pinus elliottii*, logrando la diferenciación de numerosos brotes adventicios a partir de callo, en diferentes medios de cultivo adicionados con BA, TDZ y AIB (Tang *et al.*, 2006).

Sin embargo, la organogénesis directa es la técnica de proliferación de brotes adventicios más utilizada en sistemas de micropropagación. Para lograr lo anterior, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento son optimizados para lograr las máximas tasas de multiplicación (Phillips *et al.*, 1995); por lo que se deben desarrollar protocolos para cada especie en particular (Thorpe, 2004; Hargreaves *et al.*, 2005).

4.13.5.3.1 Etapas de la ruta organogénética en coníferas.

El desarrollo de plantas *in vitro* puede ser dividido en diversas etapas o fases. Estas fases fueron descritas primeramente por Murashige (1974) y han sido adaptadas para una gran variedad de especies vegetales ya sea para fines de investigación o a nivel

comercial. Aunque inicialmente Murashige describe tres etapas para la micropropagación, otras dos fases o etapas pueden ser añadidas al proceso, quedando de la siguiente manera: Etapa 0. Selección y preparación de la planta donadora. Etapa I. Establecimiento del cultivo aséptico. Etapa II. Multiplicación de propágulos. Etapa III. Enraizamiento *in vitro*. Etapa IV. Enraizamiento *in vivo* y Aclimatación (Pierik, 1990a). Por su parte, Villalobos *et al.* (1983) describen cuatro etapas en la formación de plantas de coníferas *in vitro*: etapa 1) iniciación de las yemas; etapa 2) paso de las yemas a brotes; etapa 3) enraizamiento de los brotes y etapa 4) trasplante a suelo.

Con respecto a las fases correspondientes de la organogénesis en coníferas, diversos autores consideran, generalmente 4 etapas o fases de desarrollo, y cada una requiere manejo por separado (Von Arnold y Ericsson, 1981; Gladfeldter y Phillips, 1987; Thorpe *et al.*, 1990; Saborío, 1996).

La ruta organogénética para la regeneración de coníferas involucra las siguientes fases:

- a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias
- b) Alargamiento de yemas
- c) Multiplicación de brotes
- d) Enraizamiento

(Lambardi *et al.*, 1993; Harry y Thorpe, 1994; Hargreaves *et al.*, 2005).

a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias.

La optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo.

En ésta etapa, producto de la desdiferenciación, es donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénético o embriogénético; donde las células se determinan para formar un órgano o embrión. Generalmente, el tejido seleccionado se siembra en un medio de cultivo con alto contenido de sales minerales y se complementa con citocininas. En algunos casos, se utilizan bajos niveles de algunas auxinas (Thorpe y Biondi, 1984; Flinn *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2006).

Existen trabajos de investigadores que han estudiado los diferentes factores que pueden afectar la inducción y desarrollo de yemas adventicias, por ejemplo (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987) observaron que los embriones de *Pinus elliottii* sobre medio sólido conteniendo citocinina, respondieron a partir de la primera semana. La proliferación celular se inició a partir de los cotiledones y algunas veces de la porción del hipocotilo que estaba en contacto con el medio de cultivo. Después de 4 a 5 semanas se observó el desarrollo de yemas a partir de los embriones.

Así mismo, Hargreaves *et al.* (2004), trabajando con cotiledones de 72 genotipos de *Pinus radiata* en el medio de cultivo LP adicionado con 5 mg l⁻¹ de BA y 3 % de sacarosa, observaron que entre 79 al 89% de los genotipos formaron brotes. Saborio determinó en 1996 las condiciones requeridas para la inducción de yemas y el desarrollo

de plantas a partir de embriones de *Pinus ayacahuite*. Tal inducción se logró a partir de cotiledones que fueron cultivados por 2 semanas en el medio Bornman adicionado con 50 micromolar de BA y 3% de sacarosa: obteniendo la formación de yemas en el 75 % de los cotiledones cultivados. De forma similar, Sul obtuvo en 1995 el establecimiento y proliferación *in vitro* de *Sequoia sempervirens* mediante el cultivo de cotiledones en el medio MS adicionado con 30 mg.l⁻¹ de BA, logrando una frecuencia de regeneración de más del 90%.

Por su parte, Chesick *et al.* (1991) compararon 6 niveles de BA (0, 1, 5, 10, 20 y 50 μ M), para inducción de yemas y alargamiento de brotes en *Pinus strobus*. Encontrando que ningún embrión sobrevivió a los 5 meses sin BA; el promedio más alto para producción de brotes se observó al nivel 5 μ M (79%) y los promedios tendieron a disminuir con el incremento de BA, llegando incluso a presentarse un efecto perjudicial significativo a la concentración de 50 μ M.

En otros trabajos con *Pinus caribaea*, se probaron niveles de BA a concentraciones de (8.9, 22.2, 44.4 y 67.7 μ M) para inducción y desarrollo de brotes. El número promedio de brotes por explante que sobrevivieron, fue de 9 brotes/embrión en los tratamientos con (8.9, 22.2 y 44.4 μ M BA); el mayor número de brotes/embrión fue de 10 a razón de 67.7 μ M BA (Halos y Go, 1993). Así mismo, Liao (1993), cultivando cotiledones durante 14 días en medios adicionados con 44 μ M de BA, obtuvo la formación de brotes adventicios en *Pinus elliotti*. Sin embargo, el alargamiento de los

brotos en esta especie ha resultado inhibido cuando se usan concentraciones de 44.4 y 67.7 μM de BA (Halos y Go, 1993).

Por otro lado, con la finalidad de determinar el rango óptimo para inducción de yemas en *Pinus eldarica*, se ha evaluado el efecto de las citocininas Kin, 2ip y BA a concentraciones de 11, 22, 44 y 66 μM (Sen *et al.*, 1994). En general las concentraciones mayores de 40 μM resultan perjudiciales para la producción de brotes; la concentración de 22 μM fue óptima para producir una mejor respuesta. En ésta investigación la BA resultó la más efectiva para la inducción de yemas.

En el caso *Picea chiuahuana* (especie endémica del norte de México) se ha logrado la inducción de brotes adventicios a partir de embriones inmaduros (Mata *et al.*, 2001b), los cuales fueron cultivados en el medio de cultivo SH con la adición de un amplio rango de concentraciones de BAP, 2ip y Kin, obteniendo 11.2 yemas adventicias por embrión en promedio al adicionar 23 μM de Kin

b) Alargamiento de yemas.

Una vez concluida la etapa de inducción de yemas, es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Aitken-Chistie *et al.*, 1987; Harry y Thorpe, 1994).