



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA
DE LA MADERA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Dalbergia congestiflora* (CAMPINCERÁN)

A PARTIR DE ESTACAS CULTIVADAS EN INVERNADERO

TESIS

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

Presenta:
ALEJANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA

Director de tesis:
DR. JORGE ENRIQUE AMBRIZ PARRA
Doctor en Ciencias en Biológicas
Opción: Biología Experimental

Morelia Michoacán, Noviembre de 2014

DEDICATORIA

*Con todo mi amor y cariño,
para las 2 personas más importantes en mi vida:*

*A mi hijo
Ari Sebastián Salgado Hernández
Que me apoyó, prestándome un poco de su tiempo*

*A mi esposo
Rafael Salgado Garciglia
Que me apoyó en la realización de este logro profesional*

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Jorge Enrique Ambríz Parra, por su apoyo y respaldo, así como su valiosa asesoría durante esta investigación y para la conclusión de la presente tesis.

A los integrantes de mi mesa sinodal, D.Cs. José Cruz de León, Patricia Ríos Chávez, Crisanto Velázquez Becerra y Pablo López Albarrán. Gracias por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por abrirme sus puertas. A todos y cada uno de los profesores del Posgrado de Tecnología de la Madera POSTECMA, que de alguna u otra forma contribuyeron en mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Ing. Teresa García Moreno, por la ayuda técnica en la caracterización de la especie en estudio.

Al D.C. José Cruz de León y QFB Marisol Báez Magaña por su apoyo en la colecta de estacas de árboles de *Dalbergia congestiflora*.

A la Secretaria Estela de POSTECMA, por sus atenciones y apoyo durante los estudios de la maestría y en los trámites de titulación.

A las Biol. Yoshira López A., Ana María Huerta O. y al M.C. Rodolfo Fulgencio N., del Lab. de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, por apoyo técnico durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de maestría Patricia, Garibay, Forest, Wilbert, Chetumal, Aracely, Oswaldo, Julio, Miriam, Lupita, Lalo, Chilango y Juan Carlos, por su compañerismo y amistad.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. GÉNERO <i>Dalbergia</i> Linneo 1782	4
2.1.1. IMPORTANCIA MADERABLE DEL GÉNERO <i>Dalbergia</i>	4
2.1.2. Características morfológicas de <i>Dalbergia congestiflora</i>	5
2.1.3. Usos de <i>Dalbergia congestiflora</i>	7
2.1.4. Distribución de la <i>Dalbergia congestiflora</i>	7
2.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN ESPECIES FORESTALES	8
2.2.1. Propagación por estacas	9
2.2.1.1. Distribución de las hormonas en la planta	11
2.2.1.2. Hormonas en la propagación vegetativa	11
2.2.1.3. Métodos de aplicación de las hormonas en propagación vegetativa	12
2.2.2. Micropropagación	12
2.2.2.1. Establecimiento <i>in vitro</i>	13
2.2.2.2. Regeneración <i>in vitro</i> (multiplicación y enraizamiento)	19
2.2.2.3. Trasplante y aclimatación	20
2.2.3. Micropropagación de especies forestales	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. OBJETIVO GENERAL	27
5.1.1. Objetivos específicos	27
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	29
7.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	29
7.2.1. Obtención de yemas axilares de <i>D. congestiflora</i>	29

7.2.2.	Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>D. congestiflora</i>	30
7.2.2.1.	Regeneración y multiplicación de <i>D. congestiflora</i>	32
7.2.2.2.	Enraizado de los brotes de <i>D. congestiflora</i>	33
7.2.2.3.	Trasplante y aclimatación de las plantas propagadas de <i>D. congestiflora</i>	34
8.	RESULTADOS	35
8.1.	BROTACIÓN DE LAS ESTACAS DE <i>Dalbergia congestiflora</i> EN CONDICIONES DE INVERNADERO	35
8.1.1.	Número de brotes	35
8.1.2.	Número de explantes provenientes de los brotes	39
8.2.	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de yemas vegetativas de <i>Dalbergia congestiflora</i>	40
8.3.	Regeneración y multiplicación de <i>D. congestiflora</i>	42
8.4.	Inducción de enraizado en brotes en <i>D. congestiflora</i>	48
8.5.	Trasplante y Aclimatación de <i>D. congestiflora</i>	50
9.	DISCUSIÓN	53
9.1.	Brotación de las estacas de <i>Dalbergia congestiflora</i> en condiciones de invernadero	53
9.1.1.	Número de brotes	53
9.1.1.	Explantes a partir de brotes	55
9.2.	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de yemas vegetativas de <i>Dalbergia congestiflora</i>	56
9.3.	Regeneración y multiplicación de <i>D. congestiflora</i>	57
9.4.	Inducción de enraizado en brotes en <i>D. congestiflora</i>	59
9.5.	Trasplante y aclimatación de <i>D. congestiflora</i>	59
10.	CONCLUSIONES	61
11.	PERSPECTIVAS	62
12.	APORTE	63
13.	LITERATURA CITADA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Albura y duramen.	4
Figura 2	Árbol de <i>Dalbergia congestiflora</i> , en su hábitat en Aguililla, Michoacán, México.	6
Figura 3	Distribución de <i>D. congestiflora</i> .	8
Figura 4	Distribución de hormonas vegetales en las plantas	11
Figura 5	Enraizadores comerciales utilizados: A) Proroot (AUXINA-NP); B) Raizone Plus (AUXINA-F).	30
Figura 6	Desarrollo de los brotes en las estacas de <i>Dalbergia congestiflora</i> : A) Primeras etapas de desarrollo de los brotes 8 días; B) Brotes a los 15 días con hojas; C) Brotes a los 45 días con yemas axilares.	31
Figura 7	Número de brotes por estaca de <i>Dalbergia congestiflora</i> de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm de diámetro (basal), tratadas con 1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F (Raizone-Plus) y AUXINA-NP (Pro-root). El periodo considerado fue de A) 15 días, B) 30 días y C) 45 días de cultivo.	36
Figura 8	Longitud de los brotes (cm) en estacas de <i>Dalbergia congestiflora</i> de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm de diámetro (basal), tratadas con 1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP, a los 45 días de cultivo.	38
Figura 9	Número de explantes por estaca de <i>Dalbergia congestiflora</i> obtenidos de brotes crecidos en estacas (apical, media y basal), con diferentes enraizadores (1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP) a los 45 días de cultivo.	39
Figura 10	Número de explantes por estaca de <i>Dalbergia congestiflora</i> , en los diámetros de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm (basal) con AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP a los 45 días de cultivo.	40
Figura 11	Explantes de <i>D. congestiflora</i> durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> : A) Explante contaminado por hongos; B) Explante con necrosis; C) Explante con desarrollo de brote inicial. A los 30 días de cultivo.	42

Figura 12	Desarrollo de brote inicial en yema axilar de <i>D. congestiflora</i> en MS con 0.05 mg/L, a los 45 días del cultivo.	42
Figura 13	Porcentaje de brotación* (A), número** (B) y longitud** (C) de brotes de <i>Dalbergia congestiflora</i> en explantes cultivados en medio MS con diferentes tratamientos (T) con diversas concentraciones (mg/L) de benciladenina y ácido naftalenacético (BA, ANA). *30 días de cultivo; **45 días de cultivo.	44
Figura 14	Regeneración y desarrollo de brotes en explantes de <i>Dalbergia congestiflora</i> en medio MS a los 45 días de cultivo: A) T1 (0.05 mg/L BA y 0 mg/L ANA); B) T8 (1 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA); así como formación de callo C) T6 (0.5 mg/L BA y 0.5 mg/L ANA).	45
Figura 15	Incremento de área de callo (cm ² /unidad experimental) y número de brotes (brotes/cm ² de callo) en <i>Dalbergia congestiflora</i> en diferentes tratamientos de BA (benciladenina) y ANA (ácido naftalenacético) a los 30 días de cultivo.	45
Figura 16	Callos de <i>Dalbergia congestiflora</i> desarrollados en brotes en el tratamiento T1 (sin reguladores de crecimiento) y el tratamiento T6 (0.25 mg/L BA, 0.1 mg/L ANA), a los 30 días del cultivo.	46
Figura 17	Porcentaje de brotación a los 60 días de cultivo (A) y longitud promedio de brote a los 75 días de cultivo (B) en segmentos de callo cultivado de <i>Dalbergia congestiflora</i> en medio MS con diferentes tratamientos (T) y diversas concentraciones (mg/L) de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA).	47
Figura 18	Brotes de <i>Dalbergia congestiflora</i> regenerados en segmentos de callos cultivados en MS con diferentes tratamientos. (A) T6 con 0.25 mg/L de BA y 0.1 mg/L ANA y (B) T10 con 1 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA a los 75 días de cultivo.	48
Figura 19	Desarrollo de raíz con ácido indolbutírico (AIB): T1, 0; T2, 0.1; T3, 0.5; y T4, 1.0 mg/L. A los 8, 15 y 30 días de cultivo.	49
Figura 20	Número (A) y tamaño (B) de raíces en brotes regenerados <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia congestiflora</i> , cultivados en medio MS con diferentes concentraciones (mg/L) de ácido indolbutírico (AIB): T1, 0; T2, 0.1; T3, 0.5; y T4, 1.0. A los 30 días de cultivo.	49

- Figura 21 Brotes de *Dalbergia congestiflora* cultivados en MS y ácido indolbutírico (AIB) durante la fase de enraizado. A) Brote al inicio del cultivo; B) Brotes con 3 raíces/brote, en el tratamiento T1 (sin reguladores de crecimiento); C) Brotes con 5 raíces/brote en el tratamiento T3 (0.5 mg/L) a los 30 días del cultivo. 50
- Figura 22 Plántulas de *Dalbergia congestiflora*: A) Plántula proveniente del cultivo *in vitro*; B) Etapa de trasplante y aclimatación; C) Planta aclimatada de 45 días de cultivo. 52

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.	
Cuadro 1	Resultados de micropropagación de especies forestales.	24
Cuadro 2	Constituyentes del medio de cultivo MS (pH 5.75) (Murashige y Skoog, 1962).	32
Cuadro 3	Tratamientos con la combinación de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L) para la inducción de desarrollo de brotes en ápices y yemas axilares de <i>Dalbergia congestiflora</i> .	32
Cuadro 4	Tratamientos con la combinación de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L) para la formación de callo de <i>Dalbergia congestiflora</i> .	33
Cuadro 5	Métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de <i>D. congestiflora</i> .	41
Cuadro 6	Porcentajes de contaminación, oxidación y de explantes con brote a los 30 días del cultivo.	41
Cuadro 7	Tratamientos de porcentaje y tiempo de supervivencia de las plántulas de <i>D. congestiflora</i> durante la etapa de trasplante.	51

RESUMEN

En la presente investigación se estableció un método de propagación clonal *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* (campincerán) por el cultivo de brotes a partir de estacas cultivadas en invernadero. Se evaluó la brotación en estacas de 20 cm de longitud con tres diámetros (0.5, 1 y 1.5 cm). Éstas fueron obtenidas de un individuo adulto en campo, aplicando tres enraizadores: AIB (ácido indol-3-butírico), Auxina-F (Raizone-Plus) y Auxina-NP (Pro-root) (1, 5 y 10 ppm). Las estacas fueron cultivadas en turba-agrolita (1:1 v/v) en condiciones de invernadero y bajo riego continuo con agua corriente (n=3), evaluando el porcentaje de brotación, número y longitud de los brotes durante 45 días. A este tiempo se observó una mayor longitud del brote (10.5 cm por estaca) con 5 ppm de Auxina-F y un mayor número de brotes por estaca (11.5 brotes) con una longitud de 8 cm, con Auxina-NP en 5 ppm. Después de 5 meses de cultivo, el 66% de las estacas con 10 ppm de Auxina-F formaron 4 raíces y 40% de callo. Las estacas tratadas con Auxina-NP fueron utilizadas para el establecimiento *in vitro*, por producir el mayor número de explantes (29 yemas/estaca). El establecimiento *in vitro* de *D. congestiflora* se logró con el cultivo de yemas en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento. Se aplicaron cuatro tratamientos de asepsia, obteniendo un 80% de supervivencia de los explantes y una pérdida del 20% por necrosis con el tratamiento seleccionado, consistente en tratar los explantes con hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo) al 20% por 5 min, detergente hyclin (15%) más Tecto 60 (5.0 g/L) por 5 min y finalmente con hipoclorito de sodio más Tecto 60 (5.0 g/L) al 20% por 20 min. A los 45 días del cultivo en MS con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), el 75% de los explantes desarrolló un brote inicial de 0.5 cm de longitud con dos hojas. El mayor número de brotes (4.6 brotes/explante) con una longitud de 1.63 cm se obtuvo en el 100% de las yemas cultivadas por 45 días en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), en este medio también se observó un alto porcentaje de callogénesis. La organogénesis en callos se obtuvo en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA, presentando 1.4 brotes/cm² con una longitud de 1.6 cm. Los brotes fueron enraizados en MS con AIB, los cultivados con 0.5 mg/L de AIB produjeron 5 raíces/brote y con 6 cm de longitud y produjeron plántulas con un mayor porcentaje de supervivencia (80%) durante 30 días de aclimatación en condiciones controladas de humedad y temperatura. El trasplante exitoso se obtuvo en turba-agrolita (3:1 v/v). Posteriormente, las plántulas micropropagadas de *D. congestiflora* fueron cultivadas por 90 días en condiciones de invernadero, consiguiendo el mismo porcentaje de supervivencia.

Palabras Clave: Campincerán, callogénesis, micropropagación, yemas.

ABSTRACT

In this research a method of clonal propagation *in vitro* of *Dalbergia congestiflora* (campincerán) was established, culturing shoots from cuttings grown in greenhouse culture. Shooting of 20 cm cuttings was evaluate with three diameters (0.5, 1 and 1.5 cm). These were obtain from an adult individual in field, applying three rooting: IBA (indole-3-butyric acid), Auxin-F (Raizone-Plus) and Auxin-NP (Pro-root) (1, 5 and 10 ppm). Cuttings were grown in peat moss-perlite (1:1 v/v) in greenhouse conditions and under continuous irrigation with running water (n=3), evaluating the percentage of sprouting, number and length of the shoots for 45 days. At this time it was observed a greater length of the shoots (10.5 cm per cutting) with 5 ppm of Auxin-F and a greater number of shoots per cutting (11.5 shoots) with a length of 8 cm, with Auxin-NP in 5 ppm. After 5 months of culture, 66% of the cuttings with 10 ppm of Auxin-F formed 4 roots and 40% of callus. The cuttings treated with Auxin-NP were used for the establishment of *in vitro* for producing the largest number of explants (29 buds/stake). The *in vitro* establishment of *D. congestiflora* was achieved with the bud explants in the Murashige and Skoog (MS) culture media without growth regulators. Four aseptic treatments were utilized and a 80% survival of the explants with a loss of 20% by necrosis was obtained with the selected treatment. This consisted in treat the explants with 20% of commercial sodium hypochlorite (6% chlorine active) for 5 min, detergent hyclin (15%) more Tecto 60 (5.0 g/L) for 5 min, and finally with 20% of sodium hypochlorite more Tecto 60 (5.0 g/L) for 20 min. At 45 days after MS cultivation with 0.05 mg/L benzyladenine (BA), 75% of the explants developed an initial shoot of 0.5 cm in length with two leaves. The largest number of shoots (4.6 shoots/explant) with a length of 1.63 cm was obtained in 100% of buds grown for 45 days in MS with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L naphtalenacetic acid (NAA), in this medium was also observed a high percentage of callogenesis. Organogenesis in callus was obtained in MS with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L of ANA, presenting 1.4 shoots/cm² with a length of 1.6 cm. Shoots were rooted in MS with IBA, with 0.5 mg/L IBA produced 5 roots/shoot and 6 cm in length. They produced plantlets with higher percentages of survival (80%) for 30 days of acclimatization under controlled conditions of temperature and humidity. The successful transplant was obtained at peat moss-perlite (3:1 v/v). Subsequently, micropropagated plantlets of *D. congestiflora* were cultured for 90 days under greenhouse conditions, getting the same percentage of survival.

Key words: Campincerán, callogenesis, micropropagation, buds.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Dalbergia* es considerado uno de los que más especies contiene dentro de la familia Fabaceae, con más de 300 especies (Mabberley, 1987). Sin embargo, en la Base de Datos Mundial de Leguminosas solo se aceptan 159 especies (ILDIS, 2005). Unas 15 de ellas están entre las maderas comerciales más valiosas, como el palo de rosa de Brasil (*D. nigra*), palo de rosa de la India (*D. latifolia*), el palo negro de África (*D. melanoxylon*), el palo de rosa de Honduras (*D. stevensonni*) y el cocolobo de América Central y del sur de México (*D. retusa*), así como otras especies mexicanas (*D. congestiflora*, *D. granadillo*, *D. hipoleuca* y *D. leneata*).

Estas especies de *Dalbergia* se caracterizan por poseer una madera muy fina, con diferencia de coloración entre la albura y el duramen (Holdridge *et al.*, 1997), clasificadas como excesiva a extremadamente pesadas (Carpio, 1992) y excepcionalmente resistentes al ataque de insectos (Geilfus, 1989), con propiedades alelopáticas y fungicidas (Rodríguez, 2001; Martínez-Sotres *et al.*, 2012). Sus usos son muy diversos y van desde la fabricación de muebles, instrumentos científicos, musicales y deportivos hasta la fabricación de accesorios para maquinaria pesada (Carpio, 1992; Guridi-Gómez, 1996).

La especie *D. nigra*, palo de rosa brasileño, es una de las más codiciadas y explotadas por lo que está catalogada como en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 1992). En Michoacán, México, algunas especies del género *Dalbergia* están seriamente amenazadas por la destrucción de bosques y selvas, así como por su explotación como fuente de madera para la elaboración de instrumentos musicales, haciendo vulnerables a los recursos que aún prosperan en forma silvestre. En particular, la especie *D. congestiflora* conocida como campincerán en la meseta Purhépecha en Michoacán, es muy apreciada para la elaboración de guitarras, es reportada como una especie en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010).

Al igual que otras especies maderables sobreexplotadas, es necesario contar con sistemas de conservación y propagación para hacer su uso sustentable, según la especie se puede realizar plantaciones comerciales o bien métodos de propagación para llevar a cabo la reintroducción o reforestación. En los últimos años, el establecimiento de plantaciones forestales intensivas que puedan dar respuesta a las necesidades crecientes de madera y otros productos, se están considerando como la mejor defensa de los ecosistemas amenazados de deforestación. Por otra parte, las plantaciones forestales están incluidas en uno de los mecanismos del Protocolo de Kyoto sobre control del calentamiento global y cambio climático, ya que los bosques absorben el dióxido de carbono y lo intercambian por oxígeno (purificación del aire vía fotosíntesis), regulan el balance del agua y la temperatura de la tierra al permitir la infiltración de los mantos freáticos (Sutton, 1999; Cuevas, 2005).

La propagación vegetativa se ha utilizado ampliamente en distintas fases de los programas de conservación y mejora de muchas especies forestales, aplicándose incluso con fines operativos en especies de los géneros *Populus*, *Salix*, *Cryptomeria* y *Eucalyptus*. A medida que se han refinado las técnicas, en los países forestalmente más avanzados ya se han implementado de forma progresiva la propagación clonal, para su aplicación a las plantaciones intensivas (Park, 2002; Celestino *et al.*, 2012). Los métodos más usados en especies forestales son por acodo y estacas. Una ventaja de propagar plantas asexualmente es el reproducir toda la información genética del individuo progenitor y con ello perpetuar las características deseadas, con lo cual se logra la uniformidad genética que sirve para el establecimiento de huertos semilleros (Hartman y Kester, 1985)

Otra alternativa de propagación vegetativa es la micropropagación, una herramienta del cultivo de tejidos vegetales que tiene como principal fin la reproducción en condiciones asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido (explante) es posible regenerar en poco tiempo miles de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, este tipo de reproducción permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, en la producción de plantas en peligro de extinción y en la propagación de especies con características únicas (“elite”). Por ello, la búsqueda de los medios de cultivo y de los protocolos más apropiados para cada especie es una tarea frecuente en los laboratorios de cultivo de tejidos (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

En estas técnicas, aparte de los nutrimentos, vitaminas y otros componentes, se usan con suma frecuencia niveles de reguladores de crecimiento (fitohormonas) diferentes, dependiendo de la especie y de los procesos morfogénicos que se desean inducir. Así, algunas plantas forestales son propagadas por este método (Magallanes-Cedeño, 2004; Acosta, 2012).

Algunas especies del género *Dalbergia* han respondido a la propagación *in vitro* ya sea por medio de embriogénesis somática u organogénesis, tal ha sido el caso de *Dalbergia sisso*, *Dalbergia latifolia*, *Dalbergia lanceolararia* y *Dalbergia paniculata* (Dwari y Chand, 1997; Pradhan *et al.*, 1998; Sreedevi *et al.*, 1999).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue la micropropagación de *D. congestiflora*, a partir del establecimiento *in vitro* de yemas apicales y axilares obtenidas por la brotación de estacas cultivadas en invernadero.

2. ANTECEDENTES

2.1. GÉNERO *Dalbergia* Linneo 1782

El género *Dalbergia*, que contiene alrededor de 300 especies de plantas leñosas tropicales y subtropicales, fue nombrado en honor de los botánicos suecos de finales del siglo XVIII, Nils y Carl Gustav Dalberg (Allen y Allen, 1981). Este género comprende árboles y arbustos con hojas impares pinnadas rara vez unifoliadas, y alternas, las inflorescencias terminales o axilares cimosas o en panícula.

2.1.1. IMPORTANCIA MADERABLE DEL GÉNERO *Dalbergia*

Muchas especies de *Dalbergia* son importantes árboles maderables, valuadas por su figura decorativa dado por la diferencia de color contrastante entre la albura y duramen, la fragancia de su madera rica en aceites aromáticos. **La albura** es la capa de la madera joven del árbol de color blanco, amarillento, crema o café claro según la especie compuesto por un tejido biológicamente vivo cuya función es transportar agua y otras sustancias líquidas desde las raíces hacia el resto del árbol (Figura 1) (Mundo forestal, 2002). **El duramen** es de color mucho más oscuro que la albura, a causa de ciertas sustancia bioquímicas muy especializadas que el mismo árbol produce y que literalmente “petrifican” a las células vivas de la albura y las convierten en las células inertes del duramen (Figura 1) (Mundo forestal, 2002).



Figura 1. Albura y duramen.

El duramen es de color mucho más oscuro que la albura, a causa de ciertas sustancia bioquímicas muy especializadas que el mismo árbol produce y que literalmente “petrifican” a las células vivas de la albura y las convierten en las células inertes del duramen (Figura 1) (Mundo forestal 2002).

Es por el duramen de color atractivo que el género *Dalbergia* es conocido como los árboles de corazón. Existen varias especies famosas internacionalmente por el color del duramen como *Dalbergia nigra*, de madera rosa, así llamada debido a su aroma, excesivamente explotada en el pasado, está ahora citada por el CITES. *Dalbergia latifolia* considerada como la segunda madera rosa conocida en Oriente como "madera rosa india" o Sonokeling. *Dalbergia cearensis*, es púrpura con tiras negras, original de Brasil. *Dalbergia retusa*, conocida como el Cocobolo, de América Central, con un espectacular anaranjado decorativo. *Dalbergia melanoxylon*, granadillo negro tiene una madera intensamente negra muy demandada para construir instrumentos musicales de viento (Mundo forestal 2002). En nuestro país se encuentra *Dalbergia congestiflora* de color rojo violáceo con vetas de color oscuro utilizado para pequeñas piezas de ebanistería, pequeños artículos decorativos y artesanales, incrustaciones (Barajas-Morales y León, 1989).

2.1.2. Características morfológicas de *Dalbergia congestiflora*

Sus nombres comunes son campincerán (Michoacán), camotillo y gomerata (Jalisco). pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae), subfamilia Papilionoideae. Es un árbol pequeño de 6 m de alto con 20 cm diámetro (Figura 2). Las flores y frutos presentan brácteas; la inflorescencia con pedicelos y cáliz hispidulosos, brácteas vegetativas jóvenes, escasamente pilosas-adpresas, esencialmente glabro en los primeros años de edad; folíolos (5-) 7-10 (-13) elíptico-ovado, ápice obtuso a redondeado y retuso y de agudo a redondeado hacia la base; la mayoría de 1.5-3 (-4.5) cm largo, 1-2.3 cm ancho; inflorescencia aglomeradas en panículas irregulares, muy ramificadas, flores 2-3 cm de largo y ancho, surgen de los nudos, los folíolos en la madera vieja, los ejes de los frutos de 2- 3 cm de largo; numerosas yemas escamosas, imbricadas suborbiculares, algo leñosas y persistentes; hojas jóvenes densamente piloso-adpresas por debajo; hojas maduras glabrescentes; hojas 7-12

cm largo; flores muy numerosas, 4-5.5 mm de largo, grupos racimosos próximos en los nudos de los ejes secundarios, casi sésiles, los pedicelos de los frutos muy gruesos de 1.5-2 mm largo; bractéolas y brácteas florales casi semejantes, deciduas, 1 mm de largo a la vez más de 1 mm de ancho; corola glabra verde-amarillenta, estandarte algo rígido, obovado, retuso, atenuado hacia la base, 3.5 mm de largo; alas y quilla ligeramente cortas; androceo 3 mm de largo, dilatado hacia la base; estambres 9; ovario ovulado, largamente estipitado, estípite piloso; estilo 0.5-0.7 mm de largo, rígidos, estigma pequeño, terminal, oblicuo; frutos elíptico-oblongos, glabros (con pocos pelos extendidos usualmente persistente en el estípite), 3-4 cm de largo (excluyendo el estípite), 1.2-1.5 cm de ancho, obtuso a cortamente agudo hacia el ápice, base cortamente aguda a atenuada, aparentemente siempre una semilla, superficie conspicuamente reticulada-venulosa, usualmente suspendidos en grupos 5-10 cm de largo y ancho; estípite filiforme; semilla plana, reniforme, 2-14 mm de largo, 7-8 mm de ancho. Florece de febrero a marzo (en Guerrero), fructifica en marzo en Jalisco y Michoacán (McVaugh, 1987).|



Figura 2. Árbol de *Dalbergia congestiflora* Pittier, en su hábitat en Aguililla, Michoacán, México.

De acuerdo a Grin (2007), *D. congestiflora* (Pittier) pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, Tribu Dalbergieae y Género *Dalbergia* (Linnaeus f., 1782) (Lewis, 2005). La germinación de la semilla es sensible al alto contenido de humedad y las plantas son poco tolerantes a los cambios de temperatura.

2.1.3. Usos de *Dalbergia congestiflora*

Es una especie muy apreciada por su madera color morado y hermoso vetado, y es utilizada para la elaboración del fondo, costilla y chapa de la palma, diapasón y puentes de guitarras de estudio y clásica (Guridi-Gómez, 1996). También su madera se utiliza para elaborar artesanías, para la construcción de viviendas rurales y para fabricar mangos de herramientas, así como en la obtención de colorantes (Barragán *et al.*, 1995).

2.1.4. Distribución de la *Dalbergia congestiflora*

Se encuentra en selvas bajas caducifolias, selvas medianas subperennifolias, selvas altas perennifolias y bosques caducifolios y en la vegetación secundaria derivada de los mismos, desde los 500 hasta los 1165 msnm. Se distribuye en los estados de Michoacán (Aquila, La Huacana y Pareo), Guerrero (Coyuca de Catalán), Jalisco (La Huerta, Puerto Vallarta) y Oaxaca (Mpio. Guadalupe Ramírez, Mpio. San Felipe Usila. Dto. Silacayoapan) es una especie considerada no endémica por qué se encuentra pequeñas poblaciones en Guatemala (Figura 3) (Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Figura. 3. Distribución de *D. congestiflora*.

En el estado de Michoacán es reconocido a nivel internacional el poblado de Paracho por la elaboración de instrumentos musicales como las guitarras. Las especie del género *Dalbergia* como *D. granadillo*, *D. palo-escrito*, y *D. congestiflora*, han sido las más utilizadas para la elaboración de dicho instrumento musical, su alta explotación han llevado a la disminución de sus poblaciones (Bravo-Marentes, 2002; Castillo, 2013).

La especie está reportada en peligro de extinción según la norma actual de especies en riesgo de extinción (NOM-059-ECOL-2010) (SEMARNAT, 2010) y en la actualidad no hay programas para su propagación de *D. congestiflora* por semilla ni por estaca y en el estado existen pocos individuos (Bravo-Marentes, 2002).

2.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN FORESTALES

El éxito de las explotaciones forestales radica en la producción de maderas de excelente calidad que cumplan con los estándares exigidos por el mercado nacional e internacional. Al igual que toda actividad agrícola, la siembra de un material genético de excelente calidad es el factor más decisivo en los resultados finales del proceso. Dentro de este componente, la tendencia de la agroforestería moderna está

dirigida hacia la siembra y cultivo de clones de alto rendimiento, adaptados a ambientes específicos que permitan obtener los mayores rendimientos expresados en términos de calidad, volumen y uniformidad del producto y el tiempo a cosecha (Magallanes-Cedeño, 2004).

La propagación clonal o vegetativa de plantas es una producción a partir de partes vegetativas. En esta técnica se utilizan tejidos vegetales que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos. Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes: 1) propagación por bulbos, rizomas, estolones, tubérculos o segmentos (esquejes o estacas) de las plantas que conserven la potencialidad de enraizar; 2) propagación por injertos, segmentos de planta en tallos de plantas receptoras más resistentes; y 3) la micropropagación a partir de tejidos vegetales en cultivo *in vitro* (Hartman y Kester, 1985).

2.2.1. Propagación por estacas

Para obtener y manipular adecuadamente las estacas deben tomarse en cuenta varios factores: la alta humedad del aire, la intensidad moderada de luz, con temperaturas estables, un medio favorable de enraizamiento, y una protección adecuada contra el viento, las plagas y las enfermedades. La deshidratación de las estacas se debe evitar, pues los cortes con hojas pierden rápidamente agua por medio de la transpiración, aun cuando exista una alta humedad relativa. Lo anterior considerando que las estacas no tienen raíces y la absorción de agua es mucho más lenta, y esto afecta el estado de hidratación (Hartman y Kester, 1985).

La longitud óptima de las estacas varía según el tipo de plantas, usualmente entre 3 y 25 cm, en especies leñosas como frutales y forestales, el tamaño debe ser entre 10 y 25 cm (Cozzo, 1976). Independientemente del tipo de corte o tamaño, éstos siempre deberán contar al menos con una hoja en la punta de la estaca, para que ésta proporcione nutrientes y otras sustancias necesarias para el enraizamiento. El área donde se colocarán las estacas para el enraizamiento debe ser fresca y

sombreada (20-25°C), con una humedad relativa de la atmósfera o contenido de vapor de agua presente en el aire muy alto (más de 90%), para impedir que las plantas pierdan demasiada agua al incrementarse su transpiración y terminen marchitándose (Hartman y Kester, 1985).

No todas las plantas tienen la capacidad de enraizar espontáneamente, por lo que a veces es necesario aplicar sustancias hormonales que provoquen la formación de raíces. Las auxinas son hormonas reguladoras del crecimiento vegetal y, en dosis muy pequeñas, regulan los procesos fisiológicos de las plantas. La función de éstas es la promoción del enraizamiento mediante la división y crecimiento celular, la atracción de nutrientes y de otras sustancias al sitio de aplicación, además de las relaciones hídricas y fotosintéticas de las estacas, entre otros aspectos. La mayoría de las especies forestales enraízan adecuadamente con ácido indol-3-butírico (AIB). Un método sencillo es la aplicación de la hormona por medio del remojo de la base de las estacas (de 2 a 3 cm) en soluciones acuosas, según las instrucciones de los preparados comerciales. Para las especies forestales tropicales se recomienda la inmersión de la base de las estacas en soluciones de AIB (Hartman y Kester, 1985).

Para el enraizamiento se deben utilizar sustratos como la arena, vermiculita, turba o agrolita con alta humedad, aireada y limpia. El enraizado suele ocurrir de 4 a 6 semanas, produciendo raíces de 2 a 3 cm de longitud, siendo esta etapa ideal para realizar el trasplante a macetas con sustrato de buen drenaje, pero que contenga nutrientes y mantenga humedad (Hartman y Kester, 1985).

Mediante las técnicas de propagación vegetativa se han cultivado y propagado diversas especies arbóreas en peligro de extinción o amenazadas (Lascuráin *et al.* 2009) como *Magnolia dealbata*, *Cornus florida*, *Dyospyros riojae*, *Tabebuia donnell-smithii*, *Guaiacum officinale* y *Tilia mexicana*.

2.2.1.1. Distribución de las hormonas en la planta

En la figura 4 se describe la distribución y desplazamiento de los reguladores de crecimiento. Además las interrelaciones con los órganos de la planta (Rost, 1997).

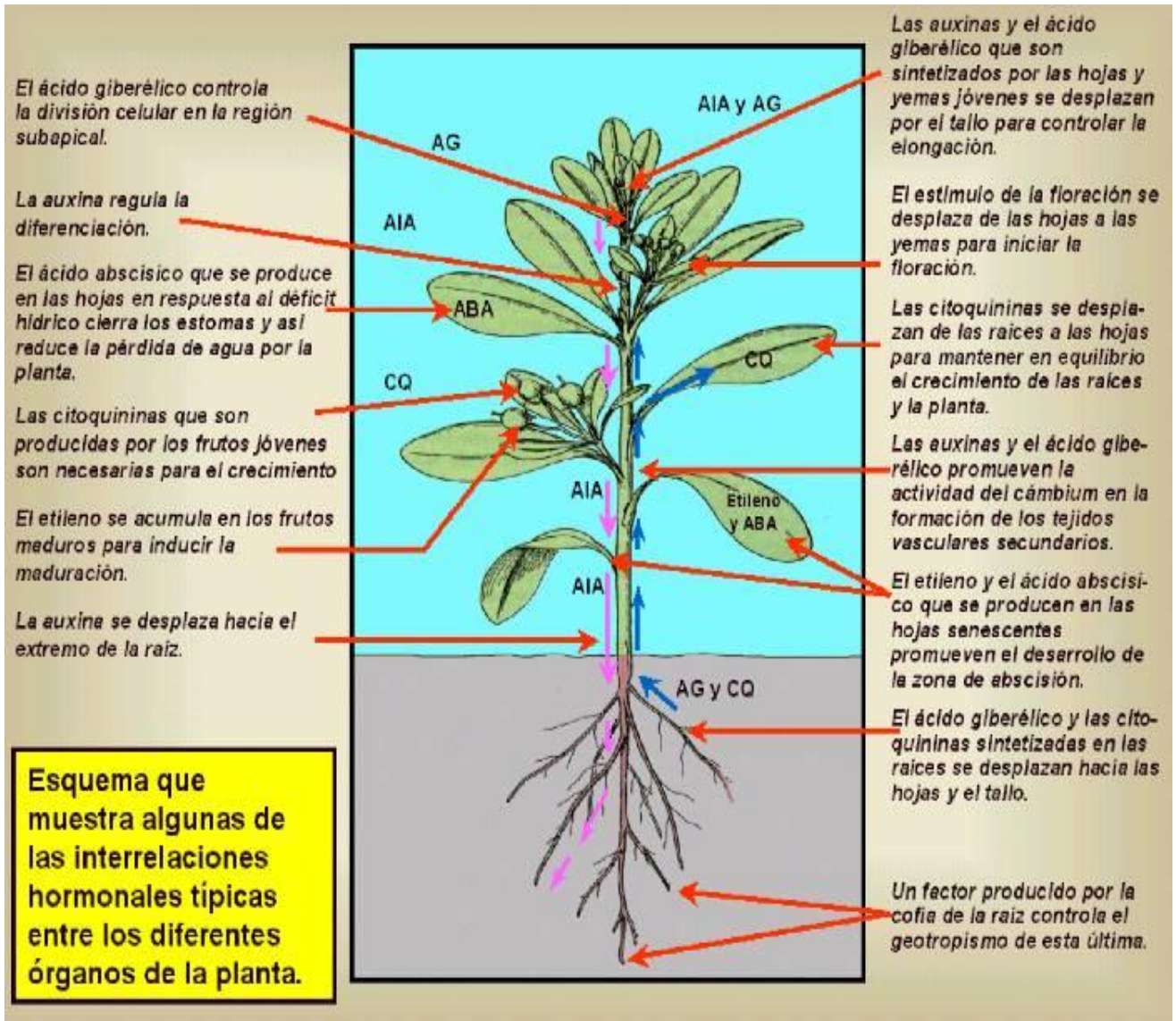


Figura 4. Distribución de hormonas vegetales en las plantas.

2.2.1.2. Hormonas en la propagación vegetativa

La formación de raíces en las estacas depende, entre otros factores del suministro natural o artificial de las hormonas vegetales denominadas auxinas, éstas son capaces de promover la diferenciación de primordios radiculares en el interior del tallo. Los reguladores auxínicos más utilizados para el enraizamiento de esquejes

son el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) (Martínes y Aguila, 1989).

El AIB es el mejor y más utilizado, dado que se descompone con relativa lentitud por la acción de los sistemas enzimáticos, además este producto se transporta poco en la planta, permaneciendo más tiempo en el lugar de aplicación. El ANA se utiliza también con bastante frecuencia, aunque es algo más tóxico para las plantas que el AIB (Martínes y Aguila, 1989).

2.2.1.3. Métodos de aplicación de las hormonas en propagación vegetativa

La aplicación de los reguladores auxínicos es mediante formulaciones rizogénicas, conocidas como enraizadores, que estimulan el enraizamiento de esquejes, estacas y plántulas (Martínes y Aguila, 1989). Existen diversas firmas comerciales en el mercado de México, basados en formulaciones de compuestos auxínicos como el Raizone Plus, Pro-Root, Radix 10,000, ente otros. Estos productos son comercializados para la multiplicación de un gran número de especies y presentan en forma de polvo o en solución.

2.2.2. Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal *in vitro*, es una tecnología bien conocida y manejada con experiencia por más de tres décadas en muchos países del mundo. En la actualidad, se conoce que ha sido aplicada con diversos objetivos: producción masiva, mejoramiento y obtención de plantas libres de patógenos (Villalobos y Thorpe, 1991). La propagación vegetativa representa una vía más directa para mantener características genéticas de un árbol elite. Dentro de este tipo de propagación, el cultivo de tejidos ofrece un gran potencial de apoyo a los métodos tradicionales, al incrementar la producción de variedades genéticamente superiores, proveniente de la selección de poblaciones, del mejoramiento convencional o de un número limitado de semillas de polinización controlada (Villalobos y Engelmann, 1995).

Las etapas principales en este proceso de propagación *in vitro* son las siguientes: 1) Establecimiento, que consiste en la desinfección de los explantes y su posterior adaptación al medio artificial; 2) Multiplicación, que busca lograr la brotación masiva de las yemas y generar nuevos explantes, hasta obtener el número deseado de nuevos individuos; 3) Enraizamiento, durante esta etapa es cuando se obtiene una planta completa, ya que se busca la formación de raíces en los brotes producidos; y 4) Trasplante y aclimatación, que consiste en adaptar las plántulas obtenidas al ambiente en el que finalmente crecerán (Villalobos, 1990).

2.2.2.1. Establecimiento *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se cultiva al explante, por lo que se deben conocer con detalle estos dos factores. El factor físico lo conforman los componentes de la luz (cantidad y calidad) y la temperatura y el factor químico está integrado por el medio de cultivo y el pH (Hurtado y Merino, 1994). Los factores que intervienen para el establecimiento *in vitro* y en los procesos de morfogénesis son varios, los más importantes se describen a continuación (Pérez-Molphe *et al.*, 1999):

Edad y estado de desarrollo de la planta.- En la mayoría de los casos, la respuesta de generación de nuevos tejidos se induce mucho más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas. Los brotes en explantes se regeneran más fácilmente cuando se toman de la parte basal de un árbol, debido a que esta zona es la que posee el carácter juvenil. La capacidad regenerativa de los cotiledones es generalmente mucho más elevada que la de las hojas que se pueden formar más tarde. El primer par de hojas de un brote es capaz de regenerar más rápidamente que las hojas subsiguientes.

Posición del explante sobre la planta.- En algunas plantas cualquier segmento de un órgano tienen la misma capacidad regenerativa. Sin embargo, en muchas plantas existen diferencias dependiendo de la edad de cada parte de la planta. Por otro lado, también se han encontrado grandes diferencias en la capacidad de regeneración de

algunos órganos según la zona, los de crecimiento (ápices y yemas) son lo más aptos para la regeneración.

Especies vegetales y cultivares.- La capacidad de regeneración de las plantas varía entre las distintas especies. Las plantas herbáceas en general regeneran mucho más fácil que los árboles y arbustos. También se ha demostrado que en algunas especies vegetales, la regeneración está en función al sexo, es decir que las plantas femeninas tienen una mayor capacidad regenerativa que las plantas masculinas.

Tamaño del explante.- Los explantes más grandes son a veces más difíciles de regenerar que los pequeños, quizá debido a la presencia de una mayor cantidad de reservas alimenticias.

Asepsia.- Es el primer paso del establecimiento *in vitro*, los explantes deberán desinfectarse (Villamizar, 2005; Suárez *et al.*, 2006) para eliminar bacterias y hongos. Para ello, existen diversos productos o compuestos químicos utilizados como desinfectantes, pero en la actualidad, se ha generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 5% (p/v), con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio [Ca (OCl)₂] del 6% al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1% al 1.5% que es muy tóxico y difícil de remover del explante. En algunos casos, resulta útil emplear un agente tenso activo, por ejemplo Tween-20 del 0.01% al 0.1%. Después de usar los desinfectantes es necesario remover los restos de éstos por medio de lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos durante mínimo 5 minutos cada uno (Roca y Mroginski, 1991).

Luego de la desinfección superficial, los explantes (partes de la planta o semillas) se colocan en un medio de cultivo estéril. En un período de una o dos semanas se inicia el proceso de germinación o de regeneración de los nuevos tejidos vegetales. Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en

contacto con un medio de cultivo estéril. Periódicamente estos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que permita mantener las condiciones de asepsia. De esta manera se aumentará el número de plantas en cada subcultivo o división de las plantas, que dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2004).

Medios de cultivo.- Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* varían con la especie, son específicos de acuerdo con la parte de la planta que se esté cultivando y la respuesta que se desee obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo. Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los explantes vegetales. Estos medios son esenciales en el laboratorio de tejidos de cultivo *in vitro* por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Se han creado numerosos medios de cultivo cuyas diferencias estriban en las cantidades y tipos de sales empleadas. Entre los más conocidos se encuentran: Murashige y Skoog (MS) (1962); Linsmaier y Skoog (LS) (1965); Borgin y Nitsch (BN) (1967); Gamborg (B5) (1970); White (1963) y el de Miller y Oyima (1968).

Los componentes de los medios de cultivo han sido objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro- y micro-elementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Villalobos *et al.*, 1990).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los macro-elementos (P, K, N, S, Ca, y Mg) y los micro- elementos (B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl)

(Roca, 1991). El nitrógeno (N), forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos, se adiciona en forma de nitrato y amonio; el magnesio (Mg), es parte de la molécula de clorofila y de los ribosomas; el calcio (Ca), es constituyente de la pared celular e interviene en la respuesta del crecimiento; el fósforo (F), forma parte de las moléculas que almacenan y transfieren la energía química de los ácidos nucleicos, de él depende la energía celular; el potasio (K), desempeña un papel importante en la regulación osmótica y en la actividad enzimática; el azufre (S), es necesario para la síntesis de algunos aminoácidos (García, 2000); el hierro (Fe), forma el núcleo del citocromo y parte de la ferredoxina; el molibdeno (Mo), es fundamental para la actividad de la nitroreductasa; el manganeso (Mn), induce la síntesis de clorofila que se requiere para la formación del O₂ en la fotosíntesis; el Boro (B), es necesario para el sostenimiento de la actividad meristemática y hace parte de la síntesis de bases nitrogenadas como el uracilo; el cobre (Cu), permite la oxidación respiratoria final y está ligado al proceso de lignificación; el zinc (Zn), es requerido para la oxidación y la hidroxilación de compuestos fenólicos; el cobalto (Co), es un componente de la vitamina B12; el cloro (Cl), es fundamental para las reacciones que llevan a la evolución del O₂ en la fotosíntesis (García, 2000).

Los azúcares son productos de la fotosíntesis de las plantas, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica no pueden fabricar el azúcar que requieren, por lo que es necesario adicionar al medio de cultivo, la sacarosa. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1%-6% de sacarosa en el medio de cultivo, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. El azúcar blanco refinado, puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos, por lo que se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99,94% de sacarosa, 0,02% de agua y 0,04% de otras sustancias (no hay indicaciones de que estas últimas puedan causar toxicidad *in vitro*) (Pierik, 1990).

Para lograr un buen crecimiento de las plantas *in vitro*, es necesario adicionar una o más vitaminas. La más utilizada es la B1 (tiamina) y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B2 (riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina H (biotina), vitamina E (α - tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg/l.

El uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico. Las fuentes de nitrógeno reducido son los aminoácidos, que están rápidamente disponibles, por ejemplo la glutamina. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento (Krikorian, 1991).

Reguladores de crecimiento vegetal en micropropagación.- son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, en rangos de 0.1 a 1 mg/L. Cada uno de los reguladores no solo influye en las respuestas según el explante, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos factores ambientales (Salisbury y Ross, 1994).

Auxinas.- son una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. Las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el AIB.

El AIA es la auxina más conocida, es una hormona natural que se produce en los ápices de los tallos, meristemos y hojas jóvenes de yemas terminales, de allí migra por el floema al resto de la planta en forma basipétala (de arriba para abajo). Durante el transporte y circulación, la auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical (Suárez, 2011).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula. La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación se presenta la elongación cuando aumenta la presión de turgencia (Cleland, 1995).

Citocininas.- son derivados de la adenina y promueve la división celular. Entre las más utilizadas están: BA (benciladenina), KIN (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas producen efectos fisiológicos como división celular, regulación de la morfogénesis, rompimiento de la dominancia apical, retraso de la senescencia foliar y la promoción de la maduración de los cloroplastos (Tisserat, 1999).

Las citocininas en interacción con las auxinas, regulan la diferenciación *in vitro*. La relación elevada de citocininas/auxinas produce brotes, la relación baja de citocininas/auxinas produce raíces (Krikorian, 1995). Las citocininas son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos, en la punta de las raíces (zonas próximas del ápice) y son transportadas vía acropétala (de abajo hacia arriba), moviéndose por los vasos correspondientes al xilema desde el ápice de la raíz hasta el tallo o brote, estimulando la división celular en tejidos no meristemáticos (Suárez, 2011).

Ajuste de pH.- Después de agregar todos los componentes del medio de cultivo, se procede a ajustar el pH final, añadiendo NaOH o KOH 0.1N, para obtener un pH de 5.8. Los valores bajos o inferiores a 3.5 pH. impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos y la absorción de los nutrientes (Rossi, 2003). Para pH mayores los nutrientes no se absorben.

Condiciones de cultivo.- La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de los procesos fisiológicos y por lo tanto es un factor fundamental que se debe controlar. Cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo (20°C-28°C). Este intervalo puede variar de acuerdo con el genotipo, tipo de explante, época del año, edad de la planta madre, fotoperiodo, etc. La humedad relativa debe estar entre 80% y 90%. El ciclo de luz oscuridad generalmente es de 16/8 horas. La luz es uno de los factores determinantes del desarrollo de los organismos autótrofos, por ello es importante controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. La luz proporciona la energía para la fotosíntesis. Las necesidades de luz *in vitro* son menores que *in vivo*, dado que el medio de cultivo tiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan parcialmente como autótrofos (Rossi, 2003).

2.2.2.2. Regeneración *in vitro* (multiplicación y enraizamiento)

La morfogénesis se produce a partir del explante inicial mediante la formación de brotes o de raíces. El cultivo de ápices y yemas es el método más común de propagación *in vitro*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser cultivadas sobre un medio nutritivo para lograr su diferenciación *in vitro* por diferentes vías de multiplicación (organogénesis directa e indirecta).

Organogénesis directa.- Es cuando los brotes se forman directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemas adventicios reaccionan rápidamente (Hartmann *et al.*, 1984).

Organogénesis indirecta.- Este método de regeneración se basa en el desarrollo de órganos (brotes o raíces) a partir de callos, es decir primero se induce a la desdiferenciación celular y a partir de éstos, la regeneración de órganos (Hartmann *et al.*, 1984).

Para que ocurran los procesos de organogénesis en este tipo de explantes, deben de añadirse algunos reguladores de crecimiento al medio nutritivo, como auxinas y citocininas, encargadas de la regeneración de brotes, enraizamiento y crecimiento de las plántulas *in vitro*. La obtención de brotes a partir del cultivo de yemas y ápices es por la influencia de una concentración relativamente alta de citocininas, lo cual frena la dominancia apical y permite el desarrollo de los brotes (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). La respuesta de regeneración *in vitro* está influenciada principalmente por las auxinas y las citocininas.

Después de la multiplicación de los brotes se requiere su individualización para el enraizamiento. El AIB es la auxina utilizada para el enraizado *in vitro* de brotes por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes. La concentración de AIB varía con la especie que se esté utilizando, puede ser utilizado desde 0.1 a 10 mg/L (Azcón, 2000). Cuando se obtiene un número suficientemente grande de brotes, éstos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo.

2.2.2.3. Trasplante y aclimatación

Las plantas formadas en condiciones *in vitro*, crecen bajo un ambiente controlado y si son llevadas a su ambiente natural, pueden deshidratarse fácilmente y morir, por lo tanto, es muy importante que sean sometidas a un acondicionamiento previo llamado endurecimiento o aclimatación. La aclimatación consiste en una gradual adaptación a condiciones ambientales del invernadero, donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento ha de ser autotrófico y no parcialmente autótrofo como sucede en condiciones de *in vitro* (Suárez, 2011).

La aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso, en la que se produce la mayor pérdida de plantas. En ella es importante el sustrato a utilizar, que debe ser acorde a la especie vegetal, con características generalmente de alta retención de agua pero un buen drenaje y un mínimo de compactación. Esta fase se inicia con la reducción gradual de la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua. Por otra parte, para tener mejores resultados durante la aclimatación es necesario el desarrollo de raíz *in vitro* (Pierik, 1990).

Durante las dos primeras semanas después del trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro*, para que las plantas se adapten a las nuevas condiciones de trasplante. Y evitar el exceso de transpiración de las plantas jóvenes, y lograr un adecuado desarrollo de sus estomas y cutícula, es necesario mantener una elevada humedad relativa (Haggman *et al.*, 1999; Sánchez, 2000).

Suárez *et. al* (2006), advierten que después de 30 días en la cámara húmeda, las plantas deben trasladarse a condiciones de invernadero, tomando en cuenta el tipo de sustrato según la especie, siempre con riego a capacidad de campo, sombra del 70% y temperatura no mayores de 25°C. Esta fase puede durar unos 30 días para alcanzar un éxito de supervivencia, fase final de la micropropagación.

2.2.3. Micropropagación de especies forestales

A pesar del gran número de leñosas obtenidas por cultivos *in vitro*, varios factores como la contaminación interna de los segmentos cultivados (explantes), la necrosis apical, la vitrificación, la oxidación, el enraizamiento y la sobrevivencia *ex vitro*, constituyen aún impedimentos para la micropropagación a gran escala (Villalobos y Thorpe, 1991).

Para la propagación de especies leñosas, se pueden emplear diferentes fuentes de explantes. Dentro de las partes que se pueden utilizar se recomiendan la zona de los nudos con diámetros de 0.5 a 1.5 centímetros, provenientes de plantas jóvenes ó germinadas bajo condiciones controladas; para plantas de 15 a 40 centímetros. Además, de estacas o de árboles adultos provenientes de viveros o de zonas cercanas al sitio donde se sembrarán (Barba, 2001).

El método más utilizado de la propagación *in vitro* es el cultivo de segmentos nodales, que consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un brote a partir de la yema. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990).

Los brotes adventicios se pueden producir a partir del explante directamente, o bien, a partir de callos derivados del explante primario. Para fines de propagación actualmente se prefiere producirlos del explante directamente, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales del cultivo (Villalobos y Thorpe, 1991).

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1982). Es importante por lo tanto, formar un banco de plántulas en invernadero utilizando semillas recolectadas de árboles sanos y vigorosos, o de plantas propagadas vegetativamente, preferentemente cercanos al sitio donde se van a plantar los futuros árboles; los explantes se toman de plantas jóvenes (Marquínez, 1998; López, 2010).

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas y la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación (Villamizar, 2005; Hernández y González, 2010). El establecimiento de cultivos *in*

in vitro de tejidos procedentes de plantas leñosas, se verá impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas. Éstas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en consecuencia inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Hernández y González, 2010).

Los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos; es por eso que la oxidación fenólica es un problema grave en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas. Se recomienda no utilizar tejidos adultos y utilizar sombra para disminuir la oxidación. Pérez y Jiménez (1995), recomiendan la incubación en condiciones de oscuridad como método para evitar la síntesis de fenoles, porque los productos de la oxidación fenólica se forman bajo condiciones de iluminación, que se manifiestan en la zona basal del corte del nudo, y en las lesiones que dejaron las hojas al ser retiradas de los nudos.

Hernández y González (2010), encontraron que la oxidación en plantas leñosas, puede ser controlada por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles, es inducida por la luz. Por lo tanto, es conveniente, que los explantes permanezcan en la oscuridad unos días, antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

La aplicación de técnicas biotecnológicas en este campo ha favorecido la producción clonal masiva y el establecimiento de plantaciones clonales de especies forestales; sin embargo, su aplicación en forestales nativos es escasa. Algunos ejemplos de especies forestales micropropagadas pertenecen a los géneros *Pinus*, *Thuja*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Eucalyptus* y *Tilia*, además de algunas especies de *Dalbergia* (*D. retusa*, *D. sisoo* y *D. latifolia*) (Gamboa y Aldenour, 1999;

Chalupa, 2002; Ndoye *et al.*, 2003; Acosta, 2012; Zurita-Valencia *et al.*, 2014)
(Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de micropropagación de especies forestales.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	MEDIOS DE CULTIVO	BROTOS	REFERENCIA
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Semilla germinada <i>in vitro</i>	BA 1.0 mg/L ANA 0.5 mg/L	1-2	Larson <i>et al.</i> , 2006
<i>Gmelina arborea</i>	Melina	Semilla germinada <i>in vitro</i>	BA 1.0 mg/L	2.7	Gamboa y Abdelnour 1999.
<i>Swietenia macrophylla</i>	Caoba	Brotos de árboles maduros	BA .05 mg/L	2.8	Abdelnour <i>et al.</i> , 2004
<i>Tectona grandis</i>	Teca	Brotos	BA 2.0 mg/L	2	Abdelnour <i>et al.</i> , 2004
<i>Tilia mexicana</i>	Cirimo	Semilla germinada <i>in vitro</i>	BA 1.0 mg/L ANA 0.25 mg/L	7.75	Zurita-Valencia <i>et al.</i> , 2014
<i>Dalbergia retusa</i>	Cocobolo	Semilla germinada <i>in vitro</i>	BA 2.0 mg/L ANA .05 mg/L	1.8	Valverde y Alvarado 2004.
<i>Dalbergia sissoo</i>	Palo de rosa	Brotos	BA 1.0 mg/L ANA 0.5 mg/L	5	Singh <i>et al.</i> , 2002
<i>Dalbergia latifolia</i>	Palo de rosa	Brotos de árboles maduros	BA 1.0 mg/L KIN 0.5-1.0 mg/L	2	Raghava <i>et al.</i> , 1992

3. JUSTIFICACIÓN

Dalbergia congestiflora, por ser una especie en peligro de extinción, tener importancia para los artesanos Michoacanos para la fabricación de instrumentos musicales, por tener un duramen amplio y poseer una madera que se cotiza internacionalmente, es importante realizar trabajos para su propagación y cultivo.

Además, debido a que no existen trabajos para su reproducción sexual y asexual, por el bajo número de individuos, la propagación vegetativa como la micropropagación, es una alternativa para su producción masiva.

4. HIPÓTESIS

La propagación de *Dalbergia congestiflora* se obtendrá con la micropropagación a partir de brotes.

5. OBJETIVOS

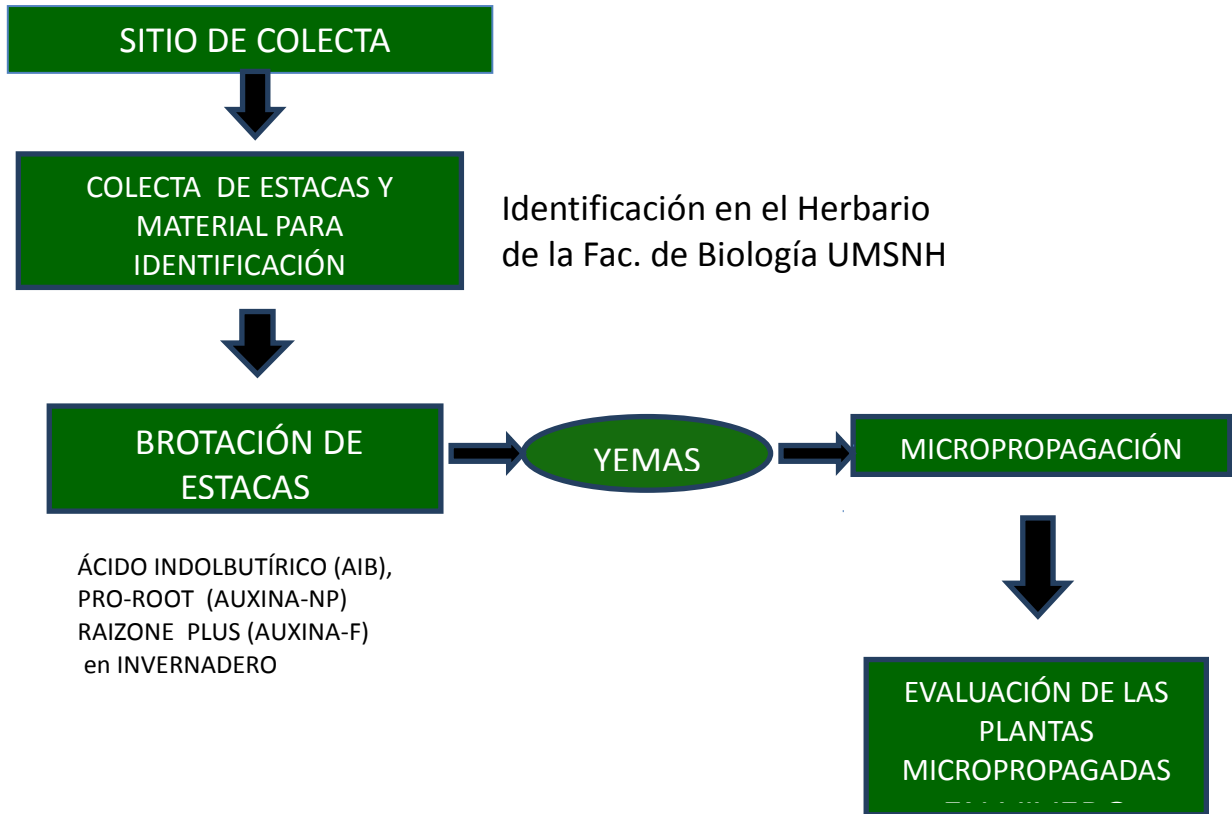
5.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer la propagación *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* Pittier a partir de estacas cultivadas en invernadero.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar la dosis óptima del AIB (Ácido indolbutírico) para la brotación de *D. congestiflora*, en condiciones de invernadero.
2. Establecer el método de asepsia para el cultivo *in vitro* de yemas apicales y axilares, provenientes de las estacas de *D. congestiflora*.
3. Determinar las condiciones óptimas de la brotación y regeneración en brotes y callos de *D. congestiflora*.
4. Determinar las condiciones óptimas de enraizado de los brotes *D. congestiflora*.
5. Determinar las condiciones de aclimatación de las plántulas *D. congestiflora*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Ramas de plantas adultas de *Dalbergia congestiflora* fueron colectadas en primavera en Carácuaro, Michoacán, México. Las plantas de este sitio se utilizaron como fuente de estacas. Éstas fueron identificadas botánicamente en el Herbario de la Fac. de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

7.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA *IN VITRO*

La propagación vegetativa se realizó por el cultivo de estacas en invernadero y cultivo *in vitro* de ápices y yemas axilares.

7.2.1. Obtención de yemas axilares de *D. congestiflora*

Las yemas axilares se obtuvieron a partir de estacas cultivadas en invernadero. Estas ramas fueron colectadas de la parte superior del árbol en dimensiones de 1.20 m de longitud, de las cuales se obtuvieron las estacas de 20 cm cada una, conteniendo de 2 a 3 nudos, que presentaban yemas pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro de color verde claro con corteza lisa y de color grisácea. De las ramas se obtuvieron tres diámetros diferentes (0.5, 1.0 y 1.5 cm) correspondientes a la parte apical, media y basal de la rama, respectivamente (Cozzo, 1976; Muñoz-Flores *et al.*, 2011). La parte apical corresponde a la zona más cercana al ápice y la parte basal es la más cercana al fuste.

Las estacas fueron cultivadas en vasos de plástico de 1L conteniendo agrolita como sustrato en condiciones de alta humedad relativa (cubierta de plástico transparente), bajo condiciones no controladas de temperatura y luz en invernadero. Éstas, previo al cultivo, fueron tratadas con la auxina enraizadora ácido indolbutírico (AIB) y dos enraizadores comerciales: Raizone-Plus® (600 ppm de AIB) y Pro-root® (400 ppm

de complejo auxínico), denominados para esta investigación como AUXINA-F y AUXINA-NP, respectivamente. La idea de utilizar estos enraizadores fue con el propósito que éstos sean accesibles en las comunidades y ejidos interesados en la propagación de *D. congestiflora* (Figura 5). Éstos se prepararon en soluciones de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm en base a la concentración de AIB y se procedió a la aplicación mediante inmersión directa por 24 h en cada una de las partes (apical, media y basal). En cada tratamiento se utilizaron de 3 a 9 estacas, dependiendo de la cantidad de material colectado y como control fue una solución acuosa (sin enraizador). Las estacas se cultivaron por 45 días, evaluando el número de brotes a los 15, 30 y 45 días.

Los explantes que se utilizaron para el establecimiento *in vitro* fueron obtenidos de los brotes crecidos de las estacas cultivadas en invernadero. Los brotes de 4 cm o de mayor longitud fueron los únicos que se utilizaron para los explantes, a los 45 días de edad. Para el número de explante por brote se consideró: el número de yemas, la resistencia a la asepsia y la turgencia del brote.



Figura 5. Enraizadores comerciales utilizados: A) Proroot (AUXINA-NP); B) Raizone Plus (AUXINA-F).

7.2.2. Establecimiento *in vitro* de *D. congestiflora*

Para el establecimiento *in vitro* se realizó una rutina de desinfección superficial de los explantes (yemas axilares) (McClelland y Smith, 1993). Dicha rutina consistió en someter los explantes Hyclin 15% durante 15 min, Etanol 70% por 2 min, Peróxido de

hidrógeno 3% por 2 min e Hipoclorito de Sodio Comercial 10% por 20 min. En todos los casos se consideró la proporción volumen:volumen (v/v). Una vez realizada la desinfección, los explantes fueron cortados para sembrar únicamente las yemas axilares en segmentos de 0.5 cm de largo y en algunos casos se consideró el meristemo apical. Los parámetros que se determinaron cada 8 días y hasta los 45 días, para evaluar el método de asepsia, fueron: porcentaje de contaminación y porcentaje de necrosis por oxidación. Una vez que se no se obtuvo contaminación y se presentó un alto porcentaje de supervivencia, todos los explantes fueron incubados los primeros cinco días en condiciones de oscuridad y 4°C para prevenir la oxidación.

El medio nutritivo utilizado para establecer los explantes asépticos fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, a un pH de 5.75 (Cuadro 2). Los reactivos que se usaron son de la marcas J.Baker® y Sigma®. El cuarto de cultivo utilizado para la incubación durante toda la experimentación tiene las condiciones adecuadas de luz, con una intensidad de 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz, así como una temperatura de 25°C.

Una vez establecido el sistema de asepsia y de prevención de oxidación, el establecimiento *in vitro* tanto de yemas apicales como de yemas axilares se realizó en el medio MS solidificado con 8 g/L de agar bacteriológico (Bioxón®) adicionado con 0.05 mg/L de benciladenina (BA) (Cuadro 2). Las yemas se cultivaron durante 45 días, evaluando el brote inicial y su longitud.

7.2.2.1. Regeneración y multiplicación de *D. congestiflora*

Los brotes obtenidos en la sección anterior, provenientes de las yemas apicales y axilares, fueron cultivados en medios de cultivo MS con diferentes concentraciones de la auxina ácido naftalenacético (ANA, 0, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/L) y de la citocinina benciladenina (BA, 0, 1 y 2 mg/L), para promover la multiplicación de brotes. Las

dosis de referencia fueron 0.05 de ANA mg/L y 1.0 de BA mg/L utilizadas en *Dalbergia sissoo* para la multiplicación de brotes (Singh *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Constituyentes del medio de cultivo MS (pH 5.75) (Murashige y Skoog, 1962).

Componente	mg/L
(NH ₄) NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
Ca Cl ₂ 2 H ₂ O	440
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	370
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	0.025
Co Cl ₂ 6 H ₂ O	0.025
Myo-Inositol	100
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Glicina	2.0
Sacarosa	30 000

Cuadro 3. Tratamientos con la combinación de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L) para la inducción de desarrollo de brotes en ápices y yemas axilares de *Dalbergia congestiflora*.

TRATAMIENTO	BA mg/L	ANA mg/L
T1	0	0
T2	1	0
T3	1	0.1
T4	1	0.25
T5	1	0.5
T6	2	0
T7	2	0.1
T8	2	0.25
T9	2	0.5

Los tratamientos donde hubo presencia de callo, se tomaron segmentos de callos de 1 cm² de área y se colocaron en MS nuevo. En dicho medio se les aplicó a los segmentos dosis altas en citocininas y dosis bajas de auxinas (Cuadro 4). El área del callo, fue obtenida a los 15, 30 y 45 días restando el área total y el área del segmento. Todos los tratamientos tuvieron 10 repeticiones (n=10).

Cuadro 4. Tratamientos con la combinación de ácido naftalenacético/benciladenina (ANA/BA) (mg/L) para la formación de callo de *Dalbergia congestiflora*.

TRATAMIENTO	BA mg/L	ANA mg/L
T1	0	0
T2	0.05	0
T3	0.1	0
T4	0.1	0.1
T5	0.25	0
T6	0.25	0.1
T7	0.5	0
T8	0.5	0.1
T9	1	0
T10	1	0.1
T11	1.5	0
T12	1.5	0.1

7.2.2.2. Enraizado de los brotes de *D. congestiflora* Pittier

Una vez obtenidos los brotes desarrollados a partir de callos (con más de dos hojas), fueron sometidos a enraizamiento en medios de cultivo MS a la mitad de sus componentes (MS ½), con 20 g/l de azúcar comercial y agar (8 g/L). Además se adicionó con auxina ácido indolbutírico (AIB) en diversas concentraciones: 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/L. La unidad experimental consistió en tubos de ensaye. Los brotes se cultivaron por 30 días, evaluando el número, color y longitud de raíz. A los 8 y 15 días, se evaluó el color y la longitud de raíz mientras que a los 30 días se evaluó el número y la longitud. Este parámetro se obtuvo, a los 8 y 15 días, a partir de la medición exterior sobre el tubo de ensaye con 3 repeticiones por tratamiento (n=3).

Para el caso de la medición de los 30 días la evaluación se realizó de forma directa sobre la raíz.

7.2.2.3. Trasplante y aclimatación de las plantas propagadas de *D. congestiflora*

Las plántulas propagadas *in vitro* fueron trasplantadas y aclimatadas de manera individual en recipientes de plástico de capacidad de 100 mL y cerrados por 8 días con plástico transparente. Se probaron diferentes sustratos que consistieron en mezclas de turba y agrolita en diferentes proporciones. La tapa del recipiente fue retirada y las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad relativa (>70%) por 30 días. A los 8, 15, 22 y 30, después del cultivo cerrado, se determinó el porcentaje de supervivencia, teniendo 10 repeticiones por tratamiento (n=10). Después del período de aclimatación bajo condiciones controladas, las plántulas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero, sin control de condiciones de temperatura y luz, con riegos de agua corriente sin permitir alta o baja humedad en suelo. A los 90 días se evaluó el porcentaje de supervivencia.

8. RESULTADOS

8.1. Brotación de las estacas de *Dalbergia congestiflora* en condiciones de invernadero

8.1.1. Número de brotes

La brotación de *Dalbergia congestiflora* Pittier inició a los 3 días de ser sembradas en la mayoría de las estacas. A los 8 días del cultivo de las estacas, en los nudos se observó la aparición de brotes, presentando una forma redondeada de 0.3 cm de longitud (Figura 6A). A los 15 días, éstos desarrollaron pequeñas hojas y alcanzaron los 3 cm (Figura 6B), obteniendo brotes hasta 4 cm de longitud, lo que formaron yemas axilares, ideales como fuente de explantes para el establecimiento *in vitro* de *D. congestiflora* (Figura 6C).

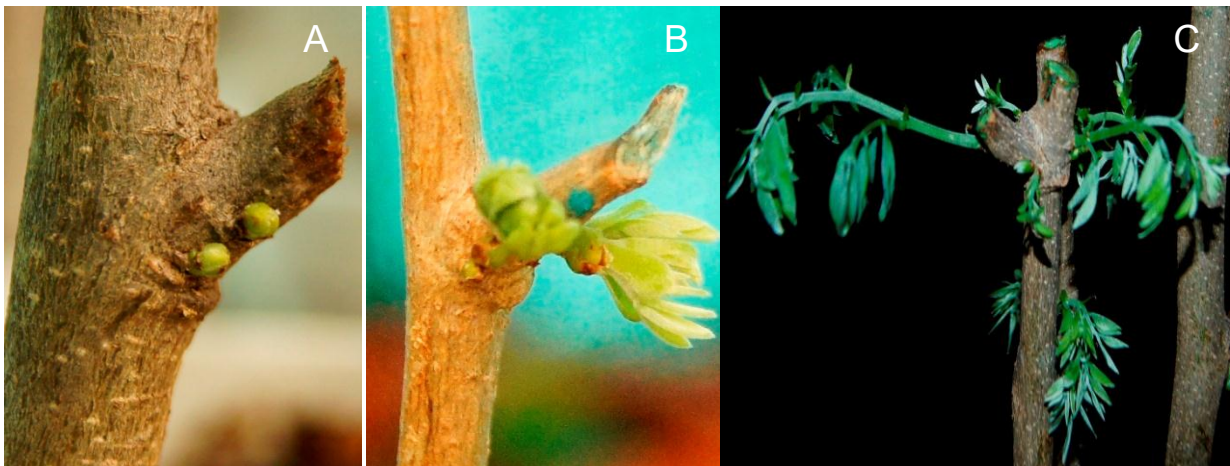


Figura 6. Desarrollo de los brotes en las estacas de *Dalbergia congestiflora*: A) Primeras etapas de desarrollo de los brotes 8 días; B) Brotes a los 15 días con hojas; C) Brotes a los 45 días con yemas axilares.

Los datos correspondientes a los 15, 30 y 45 días se presentan en la Figura 6, en la que se observa que a los 15 días del cultivo, hubo diferencias en el número de brotes/estaca en cada tratamiento, teniendo una pobre respuesta en el tratamiento control (sin tratamiento auxínico). La parte media y basal, fueron las que presentaron

mayor brotación en comparación con la parte apical, independientemente de la forma de aplicación del AIB (Figura 7A).

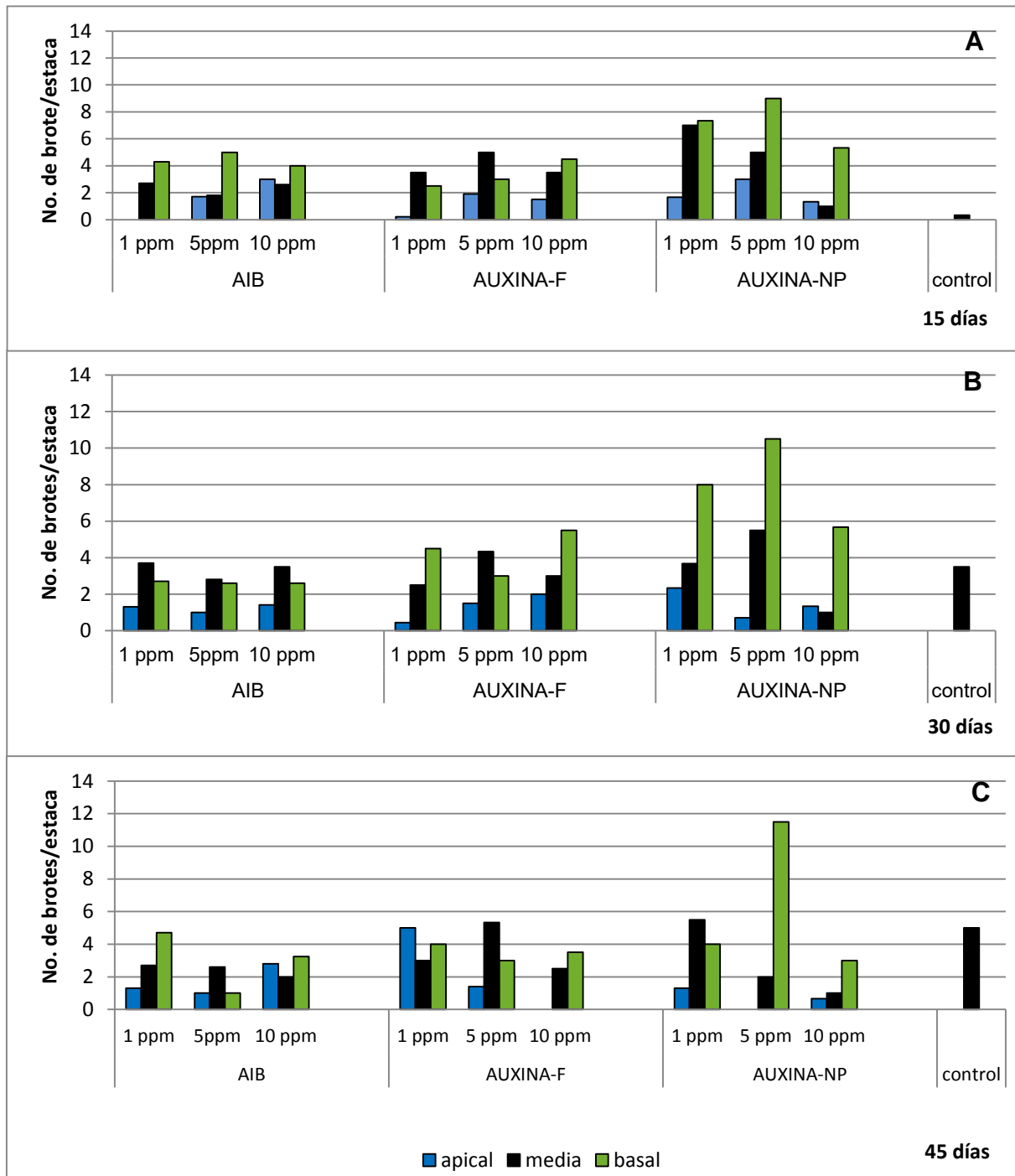


Figura 7. Número de brotes por estaca de *Dalbergia congestiflora* de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm de diámetro (basal), tratadas con 1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F (Raizone-Plus) y AUXINA-NP (Pro-root). El periodo considerado fue de A) 15 días, B) 30 días y C) 45 días de cultivo.

En la concentración de 5 ppm con enraizador AUXINA-NP se obtuvo un máximo de 9 brotes/estaca en la parte basal, seguido de la concentración de 1 ppm en la parte media y basal. Con la auxina AIB, se logró observar el mismo patrón de comportamiento, esto es, mayor respuesta en la parte basal, mientras que con la AUXINA-F, este comportamiento solo se observó con una concentración de 10 ppm y con 1 y 5 ppm se observó mayor brotación en la parte media.

A los 30 días se observó el mismo patrón que a los 15 días, con ligeras modificaciones (Figura 6B). El tratamiento con el AIB se observó la muerte de algunos brotes en la parte basal, mientras que con la AUXINA-NP a una concentración de 5 ppm, aumentaron a 10.5 brotes/estaca en la parte basal. Por último, a los 45 días de establecido el cultivo (Figura 6C), se logró observar la pérdida de algunos brotes en el tratamiento de AIB con 5 ppm y con 1 ppm de AUXINA-NP y la aparición de nuevos brotes en la parte apical a una concentración de 1 ppm con AUXINA-F. En el caso de la concentración de 5 ppm de AUXINA-NP fue el único tratamiento que mantuvo su formación creciente de brotes, llegando a formar hasta 11.5 brotes/estaca.

La variable de longitud de brote solo contempla los observados a los 45 días del cultivo. Las estacas basales fueron las que presentaron los brotes de mayor tamaño, independientemente del tipo de enraizador (Figura 7). Con 5 ppm de AUXINA-F se observaron los brotes de mayor longitud en la parte basal, seguido del tratamiento con 10 ppm de AUXINA-F y AUXINA-NP en la misma parte de la rama. Las estacas de las posición media de la rama (1.0 cm de diámetro) presentaron los brotes de mayor longitud (7.33 cm) cuando fueron tratadas con 10 ppm de AUXINA-F y el control. Aunque las estacas de la parte media no tratadas con auxina (control) formaron el menor número de brotes, éstos fueron de 5 cm de longitud, un tamaño mayor al obtenido en estacas tratadas con la mayoría de las concentraciones de los diversos enraizadores. Por último, las estacas apicales (0.5 cm de diámetro) fueron las que formaron brotes de menor tamaño, con valores menores a los 2 cm de longitud.

Es notable que el mayor número de brotes se obtuviera a los 30 días de cultivo con el enraizador de AUXINA-NP en concentraciones desde 1 ppm en las partes basales. Por lo recomendamos que para la micropropagación, las estacas se han cultivadas por 30 días para obtener más brotes y posteriormente mayor número de explantes.

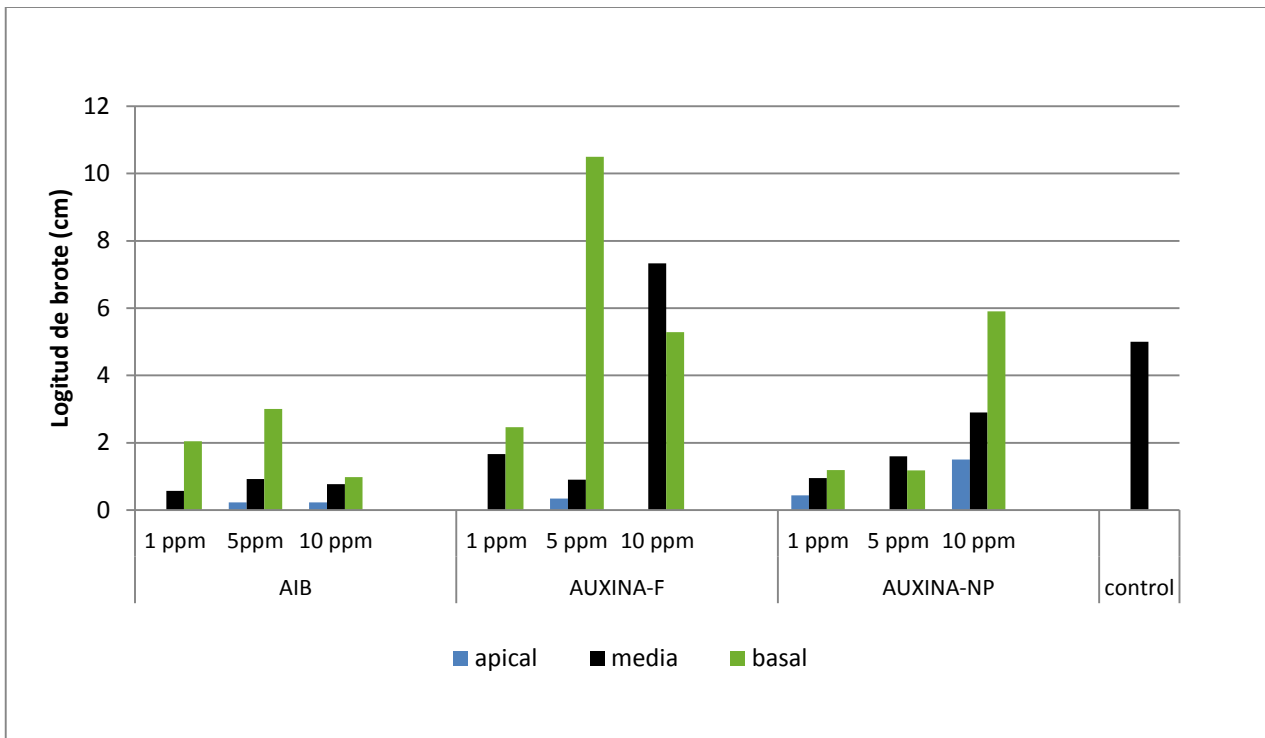


Figura 8. Longitud de los brotes (cm) en estacas de *Dalbergia congestiflora* de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm de diámetro (basal), tratadas con 1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP, a los 45 días de cultivo.

A los 5 meses de seguir mantenidas las estacas en las mismas condiciones, el 66% de las estacas basales de la concentración de 10 ppm con AUXINA-F presentaron 4 raíces, formando así una planta completa.

8.1.2. Número de explantes provenientes de los brotes

A los 45 días de edad de los brotes, el mayor número de explantes se obtuvo de la parte media y basal (Figura 9). El tratamiento con el mayor número de explantes/estaca fue el de 1 ppm de AUXINA-NP de la parte basal, con la producción de 11 explantes/estaca. El rango del número de explantes obtenidos de la parte

basal fue de 5 a 11 explantes/estaca, en los que destacan de 9 a 10 explantes/estaca con 1 ppm de AIB, 5 ppm de AUXINA-F y 10 ppm de AUXINA-NP. En la parte media de la estaca el número de explantes fue menor, con solo 6 explantes/estaca en los tratamientos de 5 ppm de AIB, 5 ppm y 10 ppm de AUXINA-F, mientras que en la parte apical solo se obtuvieron explantes en 1 ppm de AIB y 5 ppm AUXINA-F (5 y 7 explantes/estaca). Los resultados del número de explantes/estaca, independientemente de la dosis del enraizador, muestran que los tres enraizadores incrementaron el número en la parte basal y que el enraizador AUXINA-NP promueve el mayor número de explantes/estaca (Figura 9).

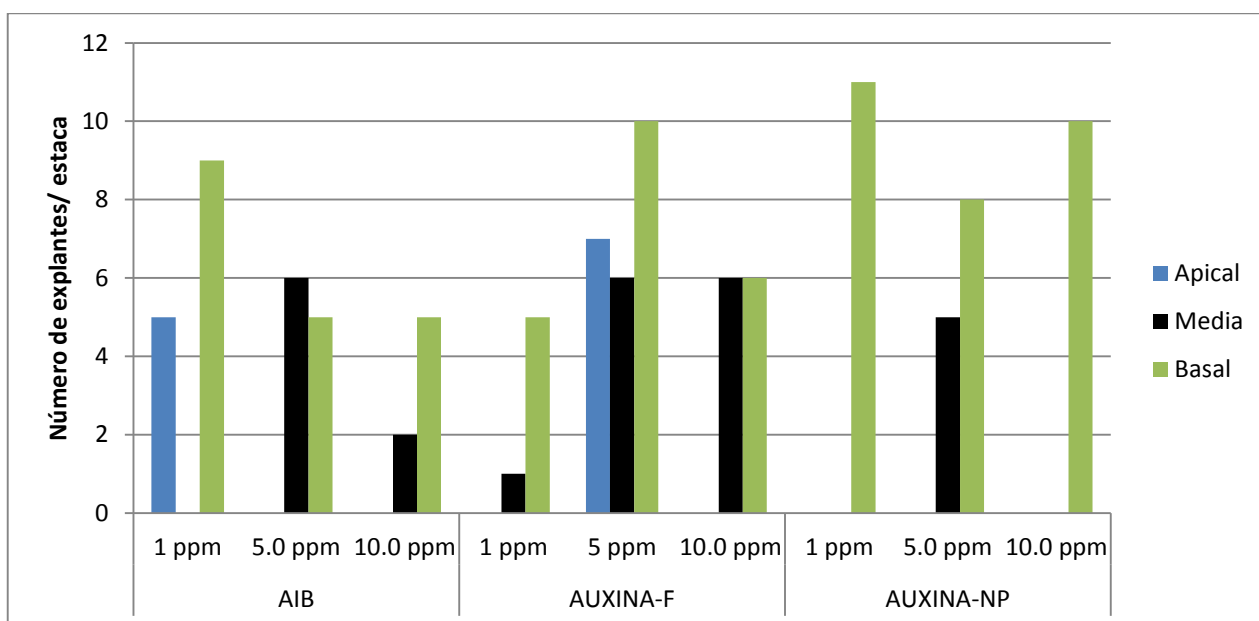


Figura 9. Número de explantes por estaca de *Dalbergia congestiflora* obtenidos de brotes crecidos en estacas (apical, media y basal), con diferentes enraizadores (1, 5 y 10 ppm de AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP) a los 45 días de cultivo.

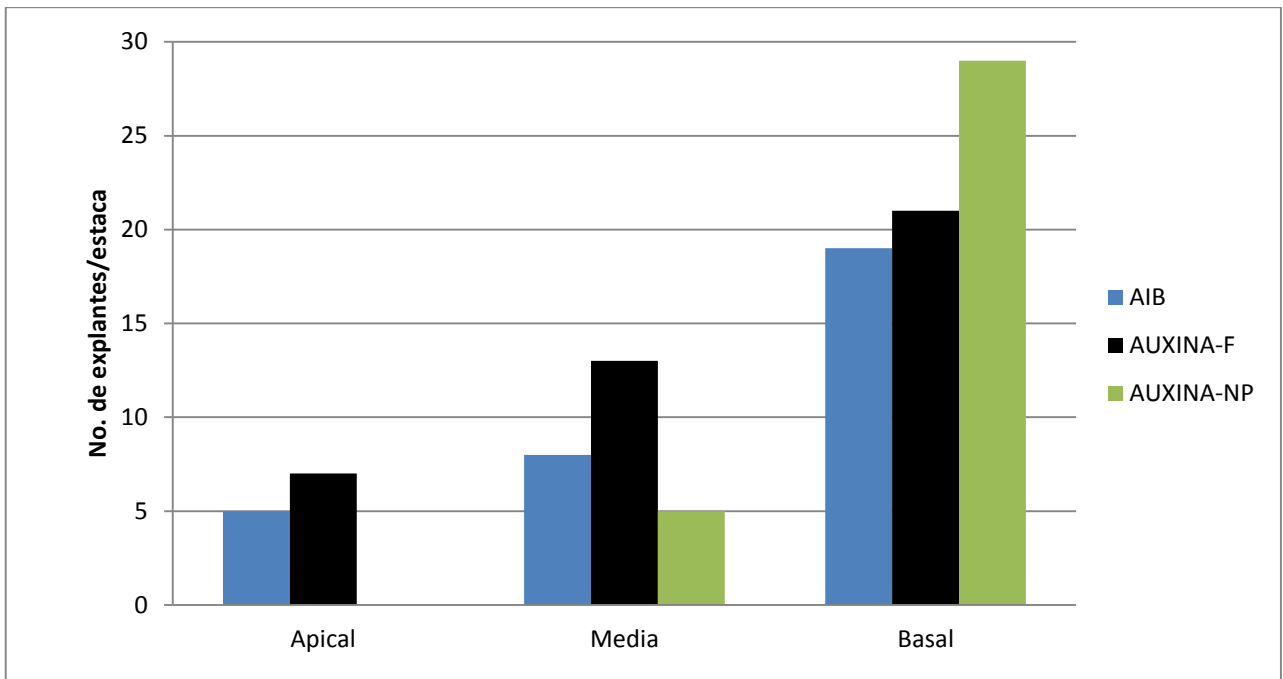


Figura 10. Número de explantes por estaca de *Dalbergia congestiflora*, en los diámetros de 0.5 (apical), 1.0 (media) y 1.5 cm (basal) con AIB, AUXINA-F y AUXINA-NP a los 45 días de cultivo.

8.2. Establecimiento del cultivo *in vitro* de yemas vegetativas de *Dalbergia congestiflora*

Los resultados con el método de asepsia inicial, fueron con un 100% de contaminación y 100% de necrosis (Cuadro 5 y Figura 10). Es por ello, que se establecieron otros sistemas de desinfección, planteados para eliminar a microorganismos endógenos. En un segundo tratamiento se modificó el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio, aumentando a 20 min, obteniendo los mismos resultados que con el tratamiento base. Con el tercer tratamiento, que consistió en adicionar un fungicida (tecto 60) en una concentración de 5 g/L, se obtuvo una reducción del 90% en la contaminación y 80% de necrosis. Por último se utilizó un cuarto tratamiento, que consintió en modificar el orden de aplicación y los tiempos de exposición (Cuadro 5 y 6).

Después de los 45 días, los explantes presentaron un brote inicial de 0.5 cm de longitud con 2 hojas cada brote, sin la presencia de raíces y sin brotes adventicios (Figura 11).

Cuadro 5. Métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *D. congestiflora*.

TRATAMIENTO	SOLUCIÓN DESINFECTANTE	CONCENTRACIÓN (%)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min)
T2	-Hyclin -Etanol -Peróxido de hidrógeno Hipoclorito de Sodio Comercial (6% cloro activo)	15 70 3 20	15 2 2 20
T3	-Hyclin -Etanol -Peróxido de hidrógeno -Hipoclorito de Sodio Comercial (6% cloro activo) + Tecto 60 (5.0 g/L)	15 70 3 20	15 2 2 20
T4	-Hipoclorito de Sodio Comercial (6% cloro activo) -Hyclin + Tecto 60 (5.0 g/L) -Hipoclorito de Sodio Comercial (6% cloro activo)+Tecto 60 (5.0 g/L)	20 15 20	5 5 20

Cuadro 6. Porcentajes de contaminación, oxidación y de explantes con brote a los 30 días del cultivo.

TRATAMIENTO	TEJIDOS PERDIDOS		SOBREVIVIENTES	
	CONTAMINACIÓN (%)	NECROSIS (%)	CONTAMINACIÓN (%)	SOBREVIVENCIA (%)
T1	100	100	0	0
T2	100	100	0	0
T3	10	20	0	70
T4	0	20	0	80*

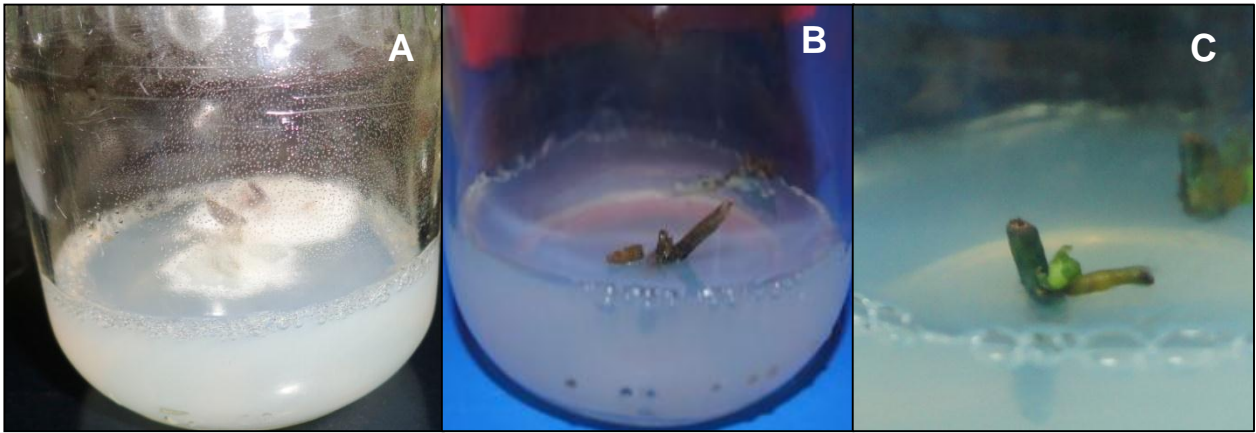


Figura 11. Explantes de *D. congestiflora* durante la etapa de establecimiento *in vitro*: A) Explante contaminado por hongos; B) Explante con necrosis; C) Explante con desarrollo de brote inicial. A los 30 días de cultivo.



Figura 12. Desarrollo de brote inicial en yema axilar de *D. congestiflora* en MS con 0.05 mg/L, a los 45 días del cultivo.

8.3. Regeneración y multiplicación de *D. congestiflora*

A los 15 y 30 días no se observaron brotes, mientras que a los 45 días de cultivo se obtuvo un 100% de brotación en los explantes cultivados en los tratamientos T1 (0.05 mg/L BA) y T8 (1.0 mg/l BA y 0.1 mg/L ANA). En los tratamientos T2, T7, T9 y T12 se obtuvo solo un 30% de brotes y en los restantes tratamientos no hubo respuesta (Figura 12A). A este mismo tiempo de cultivo se observó que el número de los brotes promedio regenerados de los explantes cultivados, fue mayor en los tratamientos T2, T1 y T8, con 1.7, 2.9 y 4.6 brotes por explante, respectivamente. En los demás

tratamientos el número de brotes promedio fue menor a uno (Figura 12B). Los brotes regenerados en el tratamiento T1 fueron los de mayor longitud con un promedio de 2.15 cm, mientras que la longitud de los producidos en los tratamientos T2 y T8 fue de 0.7 y 1.63 cm, respectivamente (Figura 12C).

En la figura 13 se muestra el desarrollo de los brotes regenerados en el tratamiento T1 y T8 (Figura 13A, Figura 13B), donde se observa el número éstos. En algunos tratamientos se formó solamente un brote y con longitud menor a 0.2 cm debido a que se presentó el proceso de callogénesis, siendo más evidente en el tratamiento T6 (0.5 mg/L BA y 0.5 mg/L ANA) (Figura 13C).

En los diferentes tratamientos de ANA y BA para la formación de callo se pudo observar dicha respuesta, excepto para el tratamiento T2 (0.05 BA y 0 de ANA). El mayor valor de área total en el callo se pudo observar en los tratamientos que contenían 0.1 de ANA, destacándose el tratamiento T6 (0.25 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA) con un área de 5.97 cm² (Figura 14). El callo en estas condiciones de cultivo se presentó con coloración verde, compacto y con la formación de pequeñas estructuras sobresalientes (Figura 15).

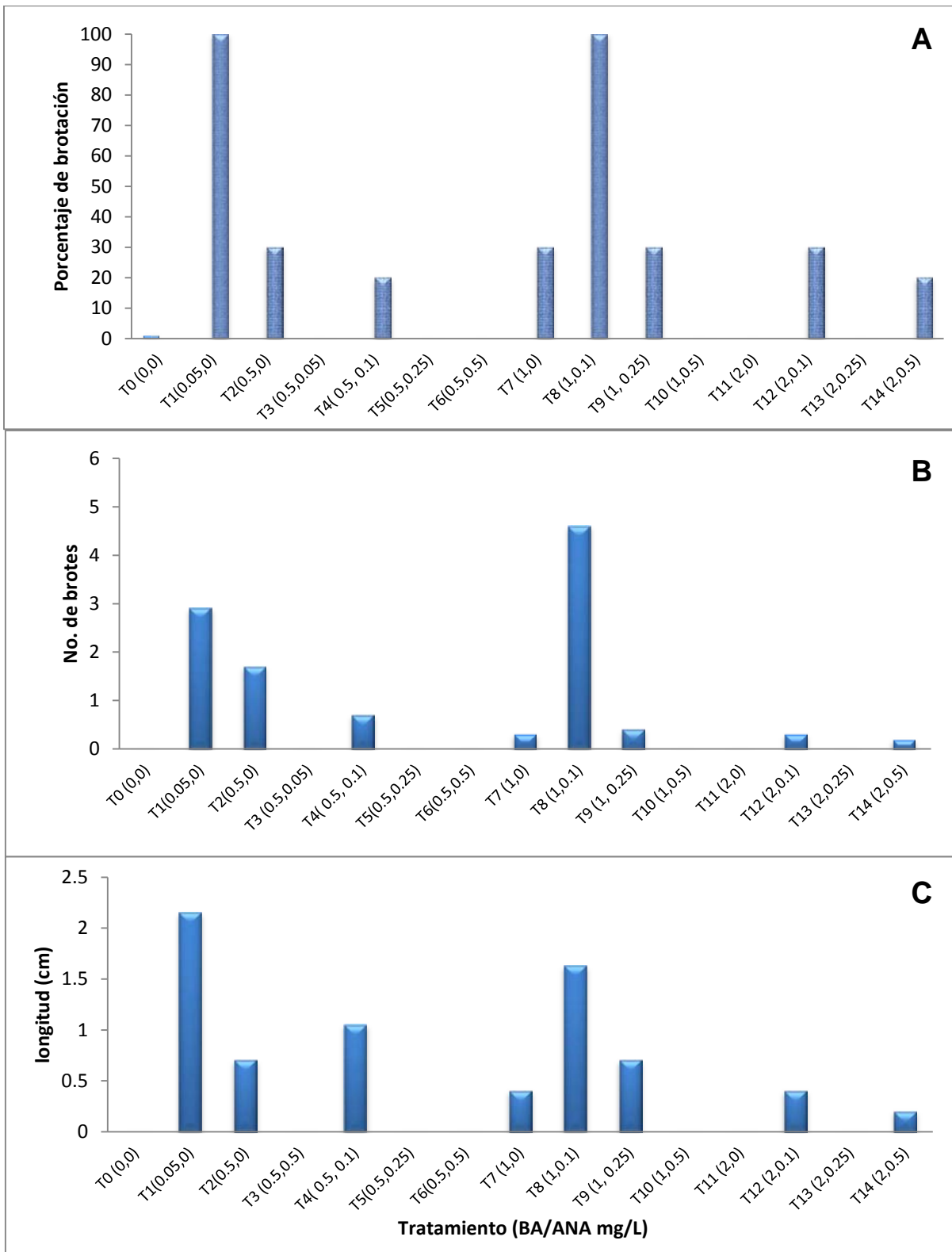


Figura 13. Porcentaje de brotación (A), número de brotes (B) y longitud (C) de brotes de *Dalbergia congestiflora* en explantes cultivados en medio MS con diferentes tratamientos (T) con diversas concentraciones (mg/L) de benciladenina y ácido naftalenacético (BA, ANA), 45 días de cultivo.

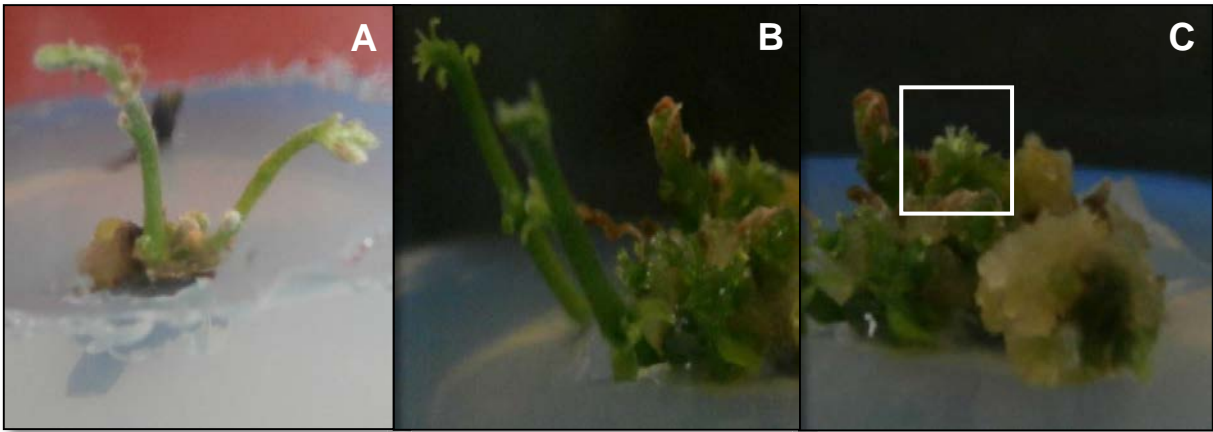


Figura 14. Regeneración y desarrollo de brotes en explantes de *Dalbergia congestiflora* en medio MS a los 45 días de cultivo: A) T1 (0.05 mg/L BA y 0 mg/L ANA); B) T8 (1 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA); así como formación de callo C) T6 (0.5 mg/L BA y 0.5 mg/L ANA).

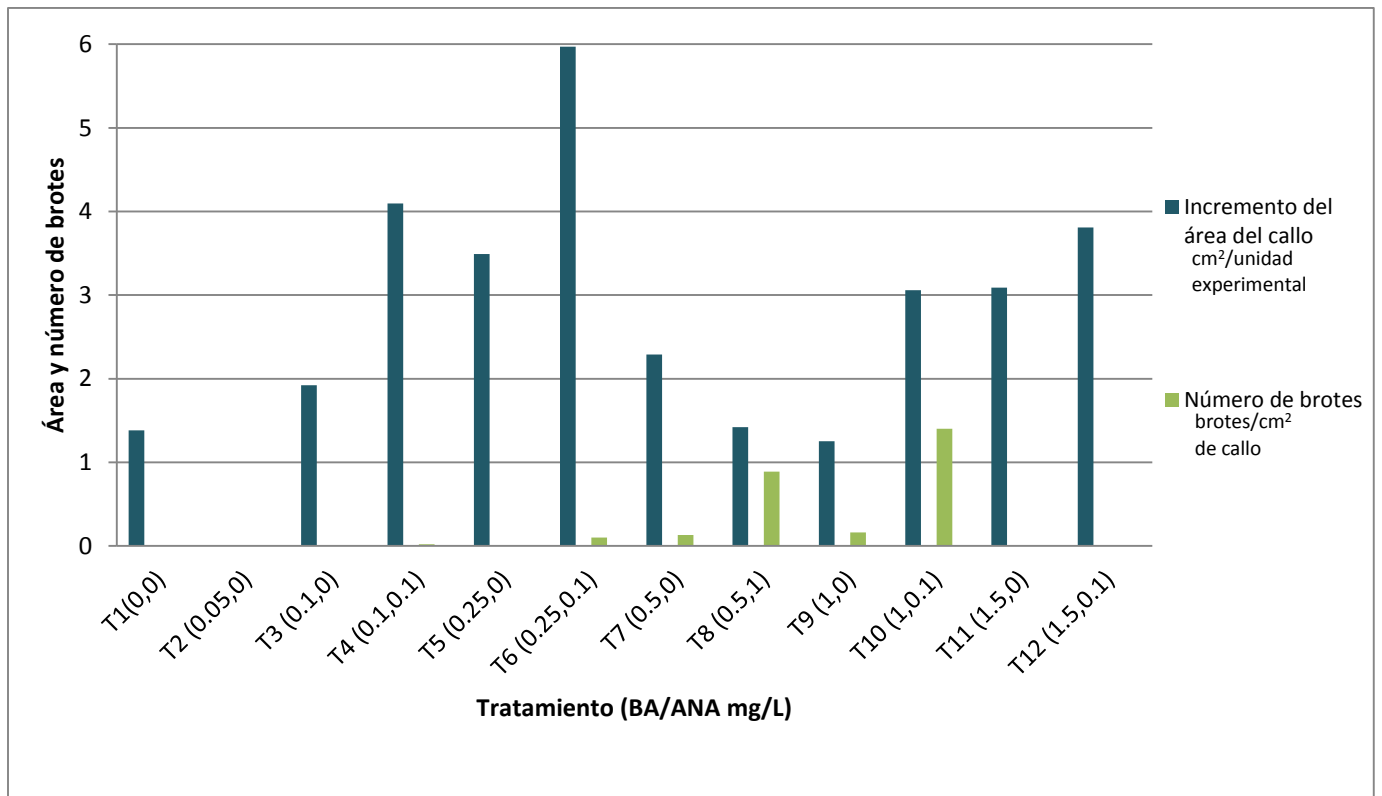


Figura 15. Incremento de área de callo (cm²/unidad experimental) y número de brotes (brotes/cm² de callo) en *Dalbergia congestiflora* en diferentes tratamientos de BA (benciladenina) y ANA (ácido naftalenacético) a los 30 días de cultivo.

Al igual que las condiciones para la producción de brote, bajo las condiciones de producción de callo también se presentó brotación. Los brotes comenzaron a regenerarse a partir de los 30 días. A los 45 días del cultivo, se obtuvieron porcentajes por arriba del 50% y solo en los tratamientos T8 (0.5 mg/L BA y 1.0 mg/L ANA) y T10 (1 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA) se observó un 80 y 100%, respectivamente (Figura 12 A).

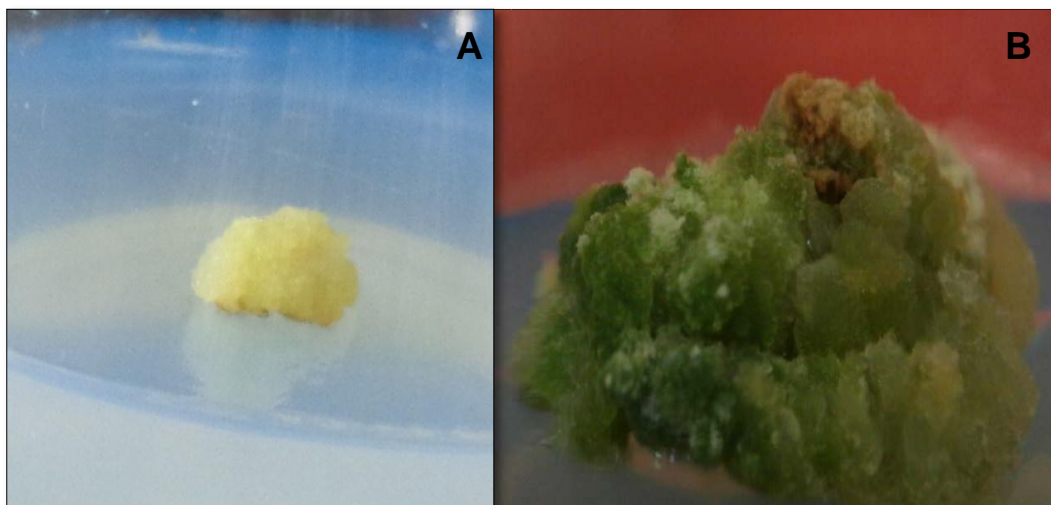


Figura 16. Callos de *Dalbergia congestiflora* desarrollados en brotes en el tratamiento T1 (sin reguladores de crecimiento) y el tratamiento T6 (0.25 mg/L BA, 0.1 mg/L ANA), a los 30 días del cultivo.

La regeneración de brotes fue determinada por el número de brotes producidos en los segmentos de callo a los 45 días del cultivo, donde el mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento T10 (1 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA), con 1.4 brotes por cm² de callo (Figura 14). Sin embargo, en otros tratamientos como T6, T7, T8 y T9 se observó la formación de brotes siendo de 0.8 para T8 (Figura 14). Entre 0.25 y 1.0 mg/L de BA se observó respuesta en la formación de brotes.

El 100% de brotación (en todas las unidades experimentales se presentaron brotes) se obtuvo en el tratamiento T10 (1 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA) y un 80% en el tratamiento T8. En los demás tratamientos T6, T7 y T9 solo fue de un 10% a 20% de brotación (Figura 16 A). Esta brotación se presentó a los 60 días de ser cultivados los callos.

La longitud promedio de los brotes regenerados de los callos cultivados de *D. congestiflora* se obtuvo a los 75 días del cultivo, observando una longitud promedio entre 1 a 1.6 cm de los brotes en los tratamientos T6 (Figura 16B), T7, T8, T9 y T10 (Figura 16B, Figura 17B). El valor de 1.6 cm correspondió al tratamiento T10, en el que se logró el mayor número de brotes regenerados (Figura 16B, Figura 14). Esta longitud promedio de los brotes se alcanzó en 15 días.

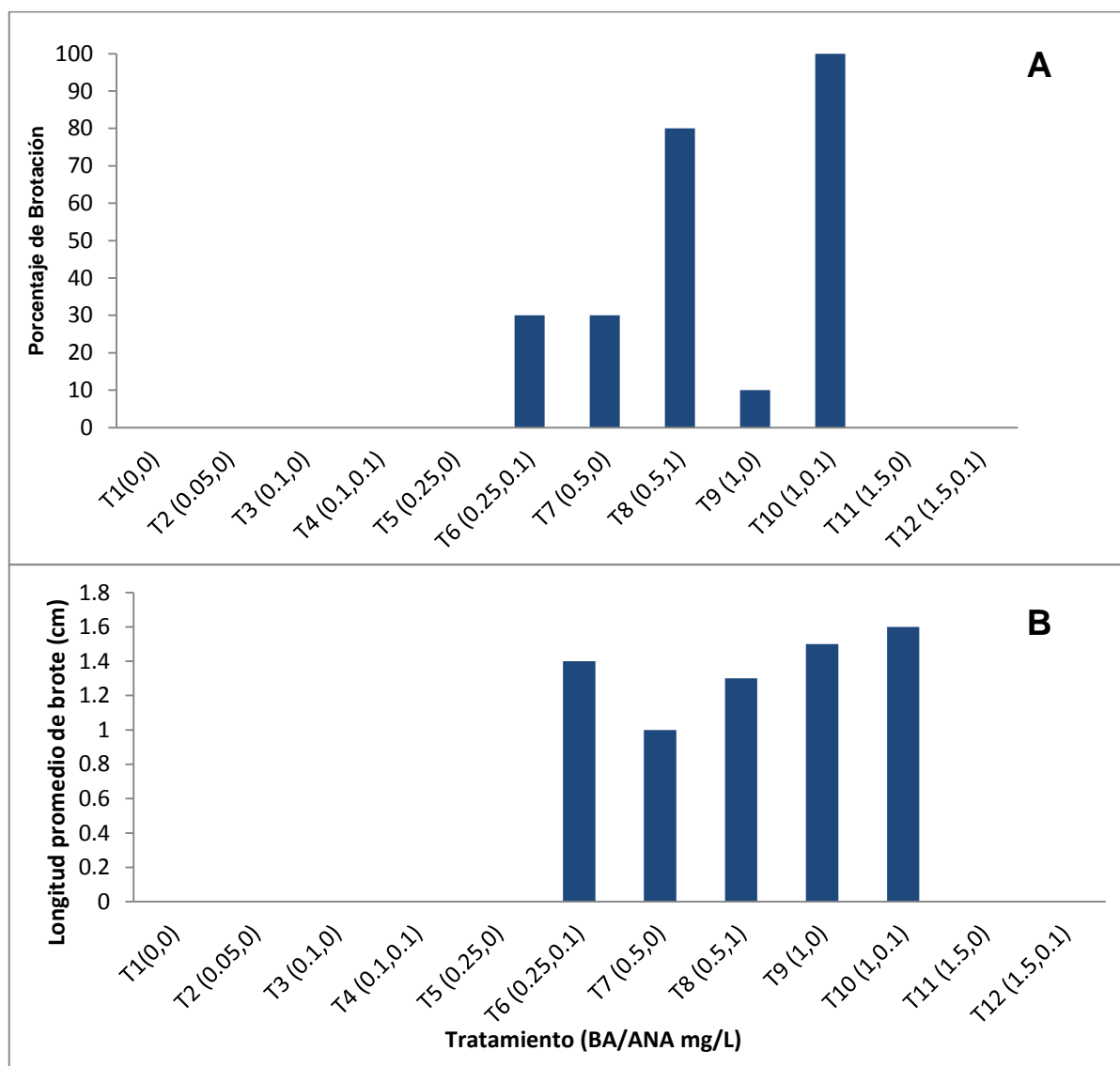


Figura 17. Porcentaje de brotación a los 60 días de cultivo (A) y longitud promedio de brote a los 75 días de cultivo (B) en segmentos de callo cultivado de *Dalbergia congestiflora* en medio MS con diferentes tratamientos (T) y diversas concentraciones (mg/L) de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA).

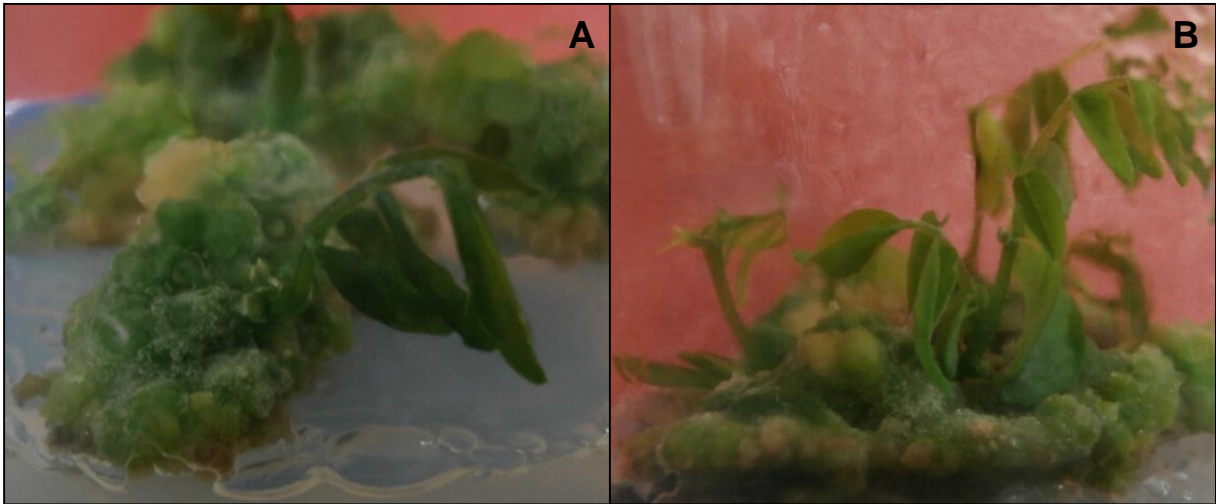


Figura 18. Brotes de *Dalbergia congestiflora* regenerados en segmentos de callos cultivados en MS con diferentes tratamientos. (A) T6 con 0.25 mg/L de BA y 0.1 mg/L ANA y (B) T10 con 1 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA a los 75 días de cultivo.

8.4. Inducción de enraizado en brotes en *D. congestiflora*

Los brotes regenerados a partir de callo cultivado de *D. congestiflora* fueron sometidos a enraizado, encontrando una respuesta óptima de este proceso ya que en todos los tratamientos probados (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L de AIB), los brotes presentaron un 100% de enraizado. A los 8 y 15 días se evaluó color y longitud, siendo en ambos casos de color beige transparente y la longitud fue aumentando como se observa en la Figura 18. El tratamiento control desde los 8 días se observó una mayor longitud respecto a los demás tratamientos, permaneciendo dicha diferencia a los 15 y 30 días.

La longitud promedio de las raíces fue mayor en los brotes cultivados sin auxina (T1) con 9.56 cm, en el tratamiento con el mayor número de raíces (T3) la longitud de éstas fue menor, con 6 cm de longitud (Figura 18). Algunos resultados de número de raíces se muestran en la figura 19, donde se observa la respuesta de los brotes de *D. congestiflora* bajo los diversos tratamientos con AIB.

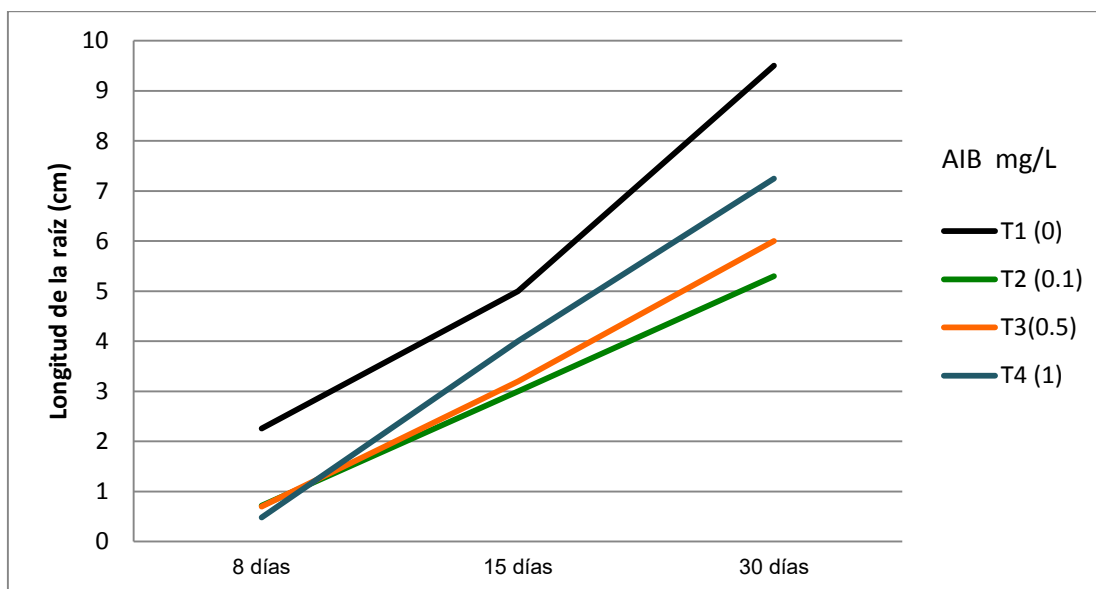


Figura 19. Desarrollo de raíz con ácido indolbutírico (AIB): T1, 0; T2, 0.1; T3, 0.5; y T4, 1.0. mg/L. A los 8, 15 y 30 días de cultivo.

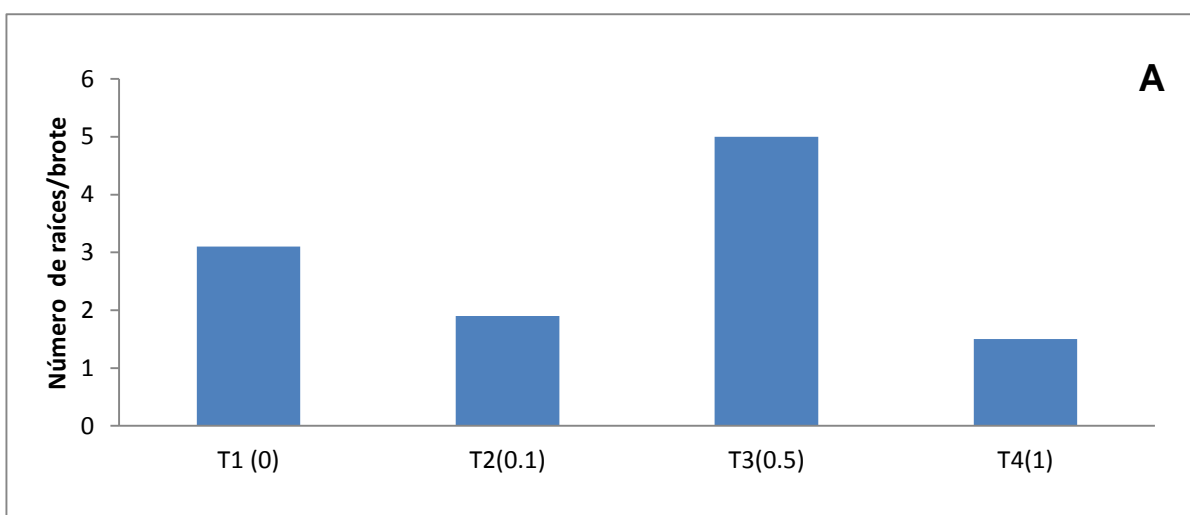


Figura 20. Número (A) y tamaño (B) de raíces en brotes regenerados *in vitro* de *Dalbergia congestiflora*, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones (mg/L) de ácido indolbutírico (AIB): T1, 0; T2, 0.1; T3, 0.5; y T4, 1.0. A los 30 días de cultivo.

A los 30 días, se pudo observar variación en el número de raíces, apareciendo en todos los tratamientos entre 2 y 5 raíces similares a las denominadas raíces seminales. En el tratamiento T3 (0.5 mg/L de AIB) se pudo apreciar el mayor número de raíces con 5 raíces, así como raíces laterales lo cual no se presentó en el resto de

los tratamientos. Mientras en los brotes cultivados sin la auxina, se formaron 3.1 raíces/ brote (Figura 20B).

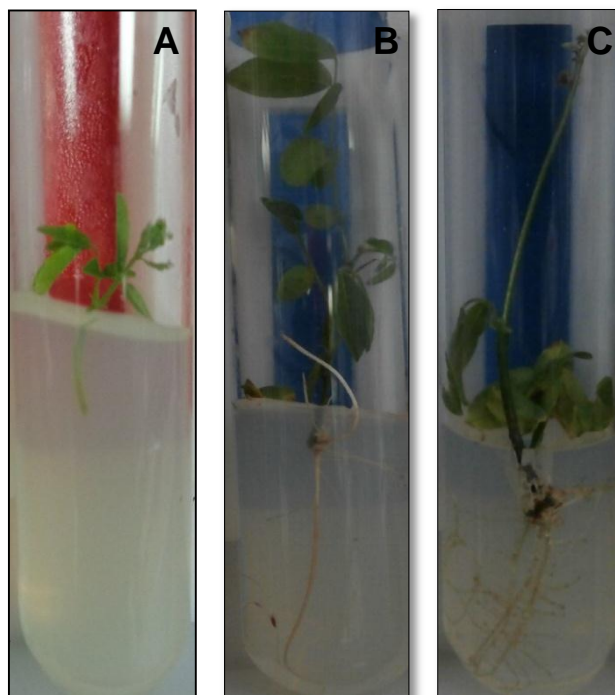


Figura 21. Brotes de *Dalbergia congestiflora* cultivados en MS y ácido indolbutírico (AIB) durante la fase de enraizado. A) Brote al inicio del cultivo; B) Brotes con 3 raíces/brote, en el tratamiento T1 (sin reguladores de crecimiento); C) Brotes con 5 raíces/brote en el tratamiento T3 (0.5 mg/L) a los 30 días del cultivo.

8.5. Trasplante y aclimatación de *D. congestiflora*

Las plantas provenientes de los tratamientos de enraizado fueron trasplantadas en diferentes tratamientos. Los tratamientos consistieron en lo siguiente: tratamiento 1 con agrolita y turba 1:1 v/v, riego con agua normal, sin condiciones controladas y sin agar en la raíz. Tratamiento 2 con agrolita y turba 1:1 v/v, con solución nutritiva, condiciones controladas y con agar en la parte de raíz y el tratamiento 3 agrolita y turba 3:1 v/v, riego con agua normal, sin condiciones controladas y sin agar.

En el cultivo cerrado hubo una supervivencia del 100% en todos los tratamientos. Con la aplicación del tratamiento 1, ya con el cultivo abierto, se obtuvo un 66% de supervivencia por 22 días con las plantas provenientes de los tratamientos de

enraizado T1, T2 y T3 (Cuadro 7). Continuando con la aplicación del tratamiento 2 se obtuvo 33% de sobrevivencia por 8 días en las plantas provenientes del T1, T2 y T3, Y con la aplicación del tratamiento 3 lograron sobrevivir hasta un 80% las plantas provenientes del tratamiento de enraizado T3 (Figura 21). Las únicas plantas que no respondieron a ningún tratamiento de trasplante fueron las que provenían de T4 de enraizado. Después de 8, 22 y 30 días todas las plantas con los diferentes tratamientos murieron paulatinamente por pudrición en la base del tallo. Las plántulas que provienen del tratamiento 3 de enraizado y con el tratamiento 3 de adaptación son las que lograron sobrevivir en un 80% a los 30 días bajo condiciones controladas y con este mismo porcentaje, 90 días después de su cultivo en invernadero (Cuadro 7 y Figura 21).

Cuadro 7. Tratamientos de porcentaje y tiempo de supervivencia de las plántulas de *D. congestiflora* durante la etapa de trasplante.

	Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
T1 (0 mg/L) AIB	33%	0%	33 %	0%	33%	0%
	22 días	23 días	8 días	9 días	30 días	32 días
T2 (0.1 mg/L) AIB	33%	0%	33 %	0%	33%	0%
	22 días	23 días	8 días	9 días	30 días	32 días
T3 (0.5 mg/L) AIB	66%	0%	33 %	0%	80%	80%
	22 días	23 días	8 días	9 días	30 días	90 días
T4 (1.0 mg/L) AIB	0%	0%	0%	0%	0%	0%



Figura 22. Plántulas de *Dalbergia congestiflora*: A) Plántula proveniente del cultivo *in vitro*; B) Etapa de trasplante y aclimatación; C) Planta aclimatada de 30 días de cultivo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura; D) Plantas micropropagadas a los 90 días de cultivo en invernadero.

9. DISCUSIÓN

9.1. Brotación de las estacas de *Dalbergia congestiflora* en condiciones de invernadero

9.1.1. Número de brotes

Las estacas de *Dalbergia congestiflora* que fueron sometidas a un tratamiento de enraizado mediante ácido indolbutírico (AIB) presentaron formación de brotes, mientras que en el tratamiento control los brotes fueron muy escasos. La utilización de dicha auxina en la propagación vegetativa ha sido ampliamente documentada. La utilización mezclas a base de AIB como AUXINA-F (Raizone-Plus) ha sido utilizado en propagación vegetativa de especies maderables (Flores, 2008), pero el AUXINA-NP (Pro-root) solo se ha probado en arbustivas (Villa-Castorena *et al.*, 2010). Por lo tanto, los resultados sugieren que la especie de *D. congestiflora* presenta la ventaja de poder ser propagada con diversas mezclas comerciales a base de AIB y especialmente con el enraizador AUXINA-NP, se obtuvo un mayor número de brotes/estaca mostrando características óptimas para el establecimiento *in vitro*.

La inducción de brotación (11.5 brotes/estaca en la parte basal) en estacas de *D. congestiflora* se observó a concentraciones de AIB de 1, 5 y 10 ppm. En especies del mismo género como *Dalbergia sisso* se ha obtenido brotación de 4.67 brotes/estaca en la parte basal en concentraciones de AIB de 2000 ppm (Husen, 2003) y en concentraciones menores de 500 ppm de AIB, han obteniendo un 80% de brotación en estacas de 20 cm (Singh *et al.*, 2012), así como en otras especies maderables, como *Plukenetia volubilis*, las concentraciones de AIB utilizadas son mayores de 10 ppm (Ruíz y Mesén 2010). Por lo que es favorable el resultado observado en *D. congestiflora* porque utilizando concentraciones bajas de AIB se obtienen una mayor cantidad de brotes en comparación de los resultados reportados en otros trabajos.

El mayor número de brotes en estacas de *D. congestiflora* se obtuvo en la parte basal con un diámetro de 1.5 cm. La propagación de esta especie mediante el método de propagación por estacas no ha sido reportada. No obstante, la respuesta

de mayor brotación en estacas de mayor diámetro ya ha sido observada en diferentes especies y nuestros resultados coinciden con dichos autores. El efecto de la brotación de estacas ha sido mencionado por varios autores a un mayor contenido de sustancias como carbohidratos, aunque trabajos sobre esta posible relación de manera específica han sido poco realizados. En lugar de explorar dicha relación se han enfocado a valorar la presencia de carbohidratos y su posible relación con el enraizamiento, mostrando en algunos casos una relación poco significativa (Tchoundjeu y Leakey, 2000), clara (Yong Kweon y Ki Sun 1996, Ling y Zhong 2012) o significativa con glucosa pero no con almidón (Denaxa *et al.*, 2012).

Los resultados en esta investigación demuestran que cuando se obtiene un mayor número de brotes, éstos son de menor tamaño, ya que el enraizador AUXINA-NP estimuló a la formación de un gran número de brotes (11.5 brotes/estaca) pero de menor longitud (1.2 cm) en la concentración de 5 ppm (AIB). Este enraizador Pro-root contiene nutrientes (N y P) y otra auxina (ANA), éste se ha utilizado en plántulas de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*) en la que se obtuvo una mayor producción de brotes con 12.7 brotes/estaca (Villa-Castorena *et al.*, 2010). En plántulas de *Jatropha curcas* L., la aplicación de AUXINA-NP no favoreció la producción de brotes debido a la baja cantidad de AIB presente, por lo que consideran que esta concentración no es suficiente para la respuesta a brotación en especies leñosas y semi-leñosas (Tuchán, 2009). Sin embargo, en las estacas de *D. congestiflora* es destacable que desde la concentración de 1 ppm de AIB presente en el enraizador AUXINA-NP favoreció a la formación de brotes e inhibió la formación de calló. Por lo que de acuerdo a estos resultados, se debe contemplar en trabajos futuros valorar el efecto de carbohidratos no estructurales en la formación de brotes, así como su número y longitud.

En AUXINA-F se observó que los brotes en los 3 tratamientos (1,5 y 10 ppm) fueron pocos (3 brotes/estaca) y de mayor longitud (5-10 cm) en general. La parte basal con la concentración de 10 ppm de (AIB) preparado con el enraizador se obtuvo (3.5 brotes/estaca) con la longitud (5.3 cm), en este tratamiento además de observar el patrón de brotes antes mencionado se observó la presencia de callo después de 5

meses. Este resultado concuerda con las estacas de *Magnolia grandiflora* donde se aplicó el enraizador AUXINA-F (Raizone-Plus) y no hubo efecto de brotación significativo pero si ayudo a la formación de raíz después de 8 meses (Flores, 2006). Este enraizador contiene (AIB y captán como fungicida) por lo que fue favorable para inducir la formación de calló. Por lo que recomendamos que para *D. congestiflora* se puede seguir explorando con este enraizador si el objetivo es el de producir planta completa.

9.1.1. Explantes a partir de brotes

La AUXINA-NP estimuló a un mayor número de brotes de menor longitud, por lo que permitió obtener una mayor cantidad de explantes/estaca, obteniendo 29 explantes en total de las 3 concentraciones utilizadas (1, 5 y 10 ppm). Además favoreció las características presentadas en los explantes de *D. congestiflora* porque presentaron una longitud mayor a 4 cm, tallo firme y hasta 5 yemas axilares por cada brote de esta dimensión, cuyas características fueron favorables para el establecimiento *in vitro* (Fig.5C). Bonga 1980, reporta que las características de favorables para el establecimiento *in vitro* de especies leñosas deben portar características de explantes juveniles, vigorosos y sanos. Dichas características se pudieron obtener en los explantes de *D. congestiflora* con el enraizador AUXINA-NP.

Además el poder mantener y seleccionar material en condiciones de invernadero mediante el uso de enraizadores en las estacas fue favorable para el establecimiento *in vitro*, porque nos permite mantener un control mayor de asepsia en los brotes producidos, se puede abastecer de explantes por un periodo amplio para aplicar diferentes técnicas de asepsia y ya no es necesario volver al sitio de colecta. Esta forma practicada de producir brotes a partir de estacas es un sistema que recomendamos para que se explore en otras especies maderables.

9.2. Establecimiento del cultivo *in vitro* de yemas vegetativas de *Dalbergia congestiflora*

Para el establecimiento *in vitro* de especies leñosas (frutales y forestales) provenientes de plantas adultas de campo, se presentan algunos problemas como la oxidación fenólica y la contaminación por hongos o bacterias.

Aunque los explantes de *D. congestiflora* provienen del cultivo de estacas en invernadero los resultados que se obtuvieron con la aplicación de los tratamientos 1 y 2 fue de un 100% tanto de oxidación como de contaminación. El mismo tratamiento con tiempo de exposición y la aplicación de las sustancias consideradas han funcionado en otras especies como en el aguacate (Cortes-Rodríguez *et al.*, 2010). En *D. retusa* se aplicó una asepsia similar en semillas y obtuvieron una contaminación del 9.5% (Valverde y Alvarado, 2004). Estos resultados en *D. congestiflora* sugieren que el tiempo de exposición al peróxido y al etanol fue prolongado y que no se tiene una sustancia efectiva para la eliminación de hongos. Por lo que la adición de un fungicida podría incrementar la sobrevivencia y disminuir la contaminación. Aunque se han reportado algunos métodos para disminuir o eliminar estas respuestas, como el uso de antioxidantes, fungicidas o antibióticos (Fanizza *et al.*, 1984; Loh y Rao, 1989).

Una sustancia que tiene propiedades antifúngicas es el tecto 60 que se ha utilizado en plantas semi-leñosas como el muicle (López-Antonio, 2013). Por ello se aplicó en los tratamientos 3 y 4 donde se observó una disminución del 80% en oxidación y para la contaminación del 100% solo variando el tiempo de exposición. La oxidación no fue eliminada por completo, lo cual podría ser por la utilización de tejidos muy juveniles. En base a los resultados se sugiere para posteriores trabajos se utilicen yemas axilares entre 3 y 5 mm de longitud.

Con este método, se pueden cultivar *in vitro* yemas de plantas “elite” de *D. congestiflora*, provenientes de diferentes individuos y diversas localidades, esto con el fin de conseguir su propagación con propósitos de multiplicar clonalmente

genotipos ya que se estos se encuentran en peligro de extinción y son de importancia maderable.

Debido a que los explantes provienen de estacas cultivadas en invernadero, es necesario tomar precauciones de asepsia extrema para asegurar el establecimiento *in vitro*.

9.3. Regeneración y multiplicación de *D. congestiflora*

En la etapa de regeneración de brotes tanto en los explantes de brote y segmentos de callo de *D. congestiflora* se empleó la combinación de la citocinina BA con la auxina ANA, que ejerció un efecto inductor en la formación de brotes dependiente de la concentración de cada uno de los reguladores de crecimiento.

Dicho efecto se observa que mayormente es en concentraciones menores de 1.0 mg/L de BA y menores de 0.1 mg/L de ANA, ya que en los tratamientos con mayor concentración de BA (T10 a T14 en explantes y T11 a T12 en callos) no hubo formación de brotes.

La combinación BA / ANA con 1.0 / 0.1 mg/L, respectivamente, fue el tratamiento con la mayor producción de brotes en ambos sistemas de regeneración. Aunque hubo la formación de brotes en tratamientos sin auxina como en los tratamientos T1, T2 y T7, para una mayor producción de brotes se requiere una concentración mayor de citocinina que auxina en una relación 1/0.1, tanto en explantes de brotes como segmentos de callo de *D. congestiflora*, resaltando que se requiere la adición de auxina para una óptima inducción de brotes.

Para la formación de brotes *in vitro*, Thorpe y Blondi (1982) señalan que se requiere un balance preciso de los componentes del medio para interactuar con el tejido y determinar la respuesta morfogénica, especialmente en la interacción cuantitativa entre las citocininas auxinas y otros factores como la luz, temperatura, etc. (Puddephat *et al.*, 1997). La adición de citocininas al medio de cultivo es

determinante para lograr la máxima brotación ya que su principal función es regular los procesos de morfogénesis, la iniciación y el crecimiento de los brotes (Brandstatter y Kieber, 1998). Por lo tanto nuestros resultados sugieren que *D. congestiflora* tiene varias combinaciones óptimas como T1 (0.05 mg/L BA y 0.0 mg/L ANA) y T8 (1.0 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA) estas dos concentraciones de citocinas y auxinas favorecieron a la brotación.

Los resultados de esta investigación, donde resulta notable que la relación 1/0.1 BA/ANA es la más efectiva para la regeneración de brotes de *D. congestiflora*, coincide con lo señalado para varias especies de plantas micropropagadas.

El máximo crecimiento (cm²) de callo se obtuvo con el tratamiento T6 (0.25 mg/L BA y 0.1 mg/L ANA), lo que implica que una concentración baja de ambos reguladores de crecimiento tuvo un efecto favorable en el desarrollo del callo. En diversas plantas se ha obtenido la formación de callo en concentraciones, relativamente bajas de citocininas y con 0.1 mg/L de auxina (Kyte y Kleyn, 1996), respuesta observada en esta investigación, en la concentración T6 (0.25 mg/L BA y 0.1 mg/L de ANA) donde la auxina es mínima promovió a la formación de callos en *D. congestiflora*.

En el caso de la longitud de los brotes, se obtuvo en los tratamientos con menor concentración tanto de BA como de ANA, en el tratamiento T1 (0.05 mg/L BA, sin auxina) en explantes en callos la longitud promedio fue entre 1.4 a 1.6 cm desde los tratamientos (T6, T7, T8, T9 y T10). Al respecto, Arredondo (2000) señala que, para obtener brotes de mayor longitud, es necesario que el medio de cultivo sea suplementado con una menor concentración de citocininas, ya que con esto se logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas. Esto confirma lo descrito por Kyte y Kleyn (1996), en cuanto a que una mayor concentración de citocininas induce la formación de brotes más pequeños. Además, los resultados corroboran lo señalado por Calderón-Baltierra y Rotella (1998), quienes determinaron que con una baja concentración de citocininas, se consigue una mayor elongación. Con estas concentraciones aumenta la citocinina y promueve la formación de brotes.

9.4. Inducción de enraizado en brotes en *D. congestiflora*

Los brotes micropropagados de *D. congestiflora* formaron un óptimo número de raíces en una concentración de 0.5 mg/L de AIB, sin embargo el mayor tamaño de éstas se obtuvo al cultivar los brotes en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Figura 18). En este tratamiento, las plantas presentaron un mejor crecimiento, con un tallo de mayor grosor y sin caída de hojas (Figura 18B), lo contrario fue observado en las plantas enraizadas con 0.5 mg/L de AIB. Lo anterior propone como mejor medio de cultivo sin adicionar auxina.

Este resultado concuerda con lo observado por Villalobos y Thorpe (1991), quienes reportan que el enraizado de brotes *in vitro* de diversas especies, generalmente ocurre sin adicionar auxinas al medio de cultivo, aunque en otras plantas, se requiere adicionar concentraciones de bajas a moderadas de auxina (0.01 – 1.0 mg/L). En *D. congestiflora* se presentó la formación de raíz sin la necesidad añadir la auxina AIB lo que se explica por su concentración interna del tejido.

9.5. Trasplante y aclimatación de *D. congestiflora*

Finalmente las plantas de *D. congestiflora* sobrevivieron en un 80% durante la etapa de adaptación y trasplante, con el tratamiento 3 de adaptación. Según Hurtado y Merino (1994) la culminación y el éxito de todo el proceso del cultivo *in vitro* consiste en la adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones en el invernadero, puesto que un gran número de plantas micropropagadas no sobreviven al paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*. La etapa de trasplante es una etapa crítica, en primer lugar porque la planta pasa por un reducido flujo respiratorio, debido a la baja intensidad de luz y elevada humedad relativa, para un ambiente que demanda un incremento en la tasa de transpiración, quedándose más susceptible al estrés hídrico. Segundo, porque la planta pasa de una existencia heterotrófica, que dependía de un suplemento de sacarosa, para un estado autotrófico.

Tercero, porque la planta pasa de un ambiente aséptico para otro donde el ataque de microorganismos saprofitos y patogénicos es común y, finalmente, porque la planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes para otra donde necesita incrementar la absorción de sales (George, 1993).

10. CONCLUSIONES

Se logró el mayor número de explantes utilizando la AUXINA-PN (Pro-root) en las estacas basales de *D. congestiflora*. Los brotes obtenidos fueron fuente de explante para el establecimiento *in vitro*, logrando la máxima brotación en el medio MS con 1.0 mg/L de BA y 0.01 mg/L de ANA. La regeneración de los brotes ocurrió de forma directa (brotes) e indirecta (callos) con la concentración antes mencionada y sobrevivieron el 80% de las plántulas tratadas con 0.5 mg/L de AIB, en el sustrato de turba-agrolita 3:1 v/v.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar las condiciones que favorezcan el desarrollo de las plántulas micropropagadas de *D. congestiflora* en invernadero y en campo.
- Desarrollar un proyecto de plantaciones de *D. congestiflora*, para uso y aprovechamiento.

12. APORTE

Las especies del género *Dalbergia* que habitan en nuestro país pueden ser propagadas por el método establecido en esta investigación.

Con el establecimiento de la micropropagación de *D. congestiflora* forma directa e indirecta (organogénesis), se puede seguir produciendo plántulas (x número) cada 45 días, sin necesidad de ir a coleccionar semilla o buscar individuos adultos para reproducirlos.

13. LITERATURA CITADA

Abedini, W. 2005. Propagación vegetativa de *Parkinsonia aculeata* L. por estaquillado. Revista de Ciencias Forestales. 12: 23-33.

Acosta, C.C. 2012. La micropropagación en especies forestales. Ciencia Actual, (2):62-80.

Allen, O.N. y Allen E.K. 1981. The Leguminosae: a sourcebook of characteristics, uses, and nodulation. Madison, WI: University of Wisconsin Press. 812 p.

Arredondo, A. 2000. Establecimiento de cadenas proliferativas y enraizamiento *in vitro* de *Juglans regia* L. a partir de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 2000. 55 p.

Azcón-Bieto, J. y Talón M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª Edición, McGraw-Hill – Interamericana de España, Madrid, España. 650 páginas.

Barajas-Morales, J. y León G. C. 1989. Anatomía de maderas de México. UNAM. pág. 70-71.

Barba-Álvarez, A., Luna-Rosales B. y Romero-Arredondo J. 2001. Micropropagación de Plantas. México, Editorial Trillas, S.A. de C.V. 107 p.

Barragán, B.E., Monroy B.M. y Peralta J. 1995. Aplicaciones tecnológicas del colorante presente en la madera *Dalbergia congestiflora*. Información Tecnológica, 6(4):31-35.

Bonga, J. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: plant cell culture: results and perspectives (F. Sala, B. Parisi, R. Cell y O. Ciferrieds, Eds.). Elsevier/North Holland Biomedical.Press. pp. 254-263.

Brandstatter, I. y Kieber J.J. 1998. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis. Plant Cell. Vol. 10 (6): 1009-1020.

Calderón-Baltierra, X. y Rotella A. 1998. Establecimiento *in vitro* de *Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kostermans (Lauraceae). Información Tecnológica, 9(5): 269-275.

Carpio, I. 1992. Maderas de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José. 338 p.

Castillo, A. 2009. *Multiplicación in vitro de especies vegetales*. Unidad de Biotecnología. Universidad ORT. Uruguay.

Celestino, C., Hernández H. y López D. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria*, 14 (3):345-357.

Cleland, R.E. 1995. Auxin and cell elongation. En: *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Davies P.J., Ed.). Kluwer Academic Publishers. pp. 214–227.

Chalupa, V. 2002. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. *Journal of Forest Science*, 48:529-535.

CITES. 1992. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES). Apéndice I.

Contreras, V. y Ochoa A. 2003. Estacas gordas y gruesas; una opción agronómica para la siembra vegetative de *Gliricida sepium*. *Zootecnia Tropical*, 21(4):413-423

Cortés-Rodríguez, M.A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Suárez-Rodríguez L.M., Hernández-García A., Ángel Palomares M.E., Vidales Fernández I. y Salgado-Garciglia R. 2011. *In vitro* propagation of mexican race avocado *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*. *Acta Hort.*, 923(ISHS 2011): 47-52.

Cozzo, D. 1976. Tecnología de la forestación en Argentina y América Latina. Ed. Hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina. 610 p.

Cuevas, A.B. 2005. El papel de los bosques en el Protocolo de Kyoto: el caso del manejo forestal de Nueva Zelanda y México, México y la cuenca del pacífico. 8(24): 62-73.

Das, P., Samentary S., Roberts A.V. y Routt G.R. 1997. *In vitro* somatic embryogenesis of *Dalbergia sissoo* ROXB. a multipurpose timber yielding tree. *Plant Cell. Rep.*, 16(8):578-582.

Davies, P.J. 1995. *The Plant Hormones: Their nature, occurrence and factors in plant physiology, biochemistry and molecular biology*. (Davies P.J., Ed.). Kluwer Academic Publishers. pp. 13–38.

Denaxa, N.K, Roussos P.A. Damvakaris T. y Stournaras V. 2012, Comparative effects of exogenous glycine betaine, kaolin clay particles and ambiol on photosynthesis, leaf sclerophylly indexes and heat load of olive cv. Chondrolia Chalkidikis under drought. *Scientia Horticulturae*, 137: 87–94.

Dodds, J.H. y Roberts L.W. 1995. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. S. A. 178 p.

Dwari, A. y Chand P.K. 1996. Evaluation of explants, growth regulators and culture passage for enhanced callus induction, proliferation and plant regeneration in the tree legume *Dalbergia lanceolaria* *Phytomorphology*, 46(2):121-131.

Fanizza, G.O., Tanzarella A. y Carrozzo G. 1984. Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. *Ann. Applied Biol.*, 104: 577-578.

Flores, R.A. 2006. Propagación por acodo aéreo de *Magnolia grandiflora* L. Tesis de Ingeniería en Restauración Forestal. Chapingo, Texcoco Edo. De México. 59 p.

Gallardo, J., Freire M., León J., García Y., Pérez S. y González M. 2008. Comportamiento en la brotación de las yemas de estacas de *Guadua angustifolia* Kunth empleadas en la propagación. *Cultivos Tropicales*, 29(1):17-22.

Gamboa, J. y Aldenour A. 1999. Micropropagación de Melina (*Gmelina arborea* ROBX). *Agronomía Costarricense*, 23:69-76.

Geilfus, F. 1989. El árbol al servicio del agricultor. Manual de Agroforestería para el desarrollo Rural 2. Guía de Especies. Enda-Caribe/CATIE. Editorial Santo Domingo. 778 p.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The technology. Exegetics Ltd., 2nd Ed., England. 574 p.

Grin, 2007. Germplasm Resources Information Network, USDA (United States Department of Agriculture). Genus *Dalbergia* L. f. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genus.pl?3367>

Grout, B.W.W. 1975. Wax development on leaf surface of *Brassica oleracea* var. *currawong* regenerated from meristem culture. *Plant Sci. Lett.*, 5: 401-405.

Guridi-Gómez, L.I. 1996. Caracterización macroscópica de cuatro especies tropicales mexicanas: Campincerán (*Dalbergia congestiflora* Pittier), Granadillo o Zangalicua (*D. granadillo* Pittier), Palo escrito (*D. palo–escrito* Rzedowski–Guridi) y Granadillo (*Platymiscium lasiocarpum* Sandw.). *Ciencia y Tecnología de la Madera*. Morelia, México. 8: 3–14.

Haggman, H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi A., Niemi K. y Aronen T. 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany*, 341: 1769-1777.

Hartman, H.T y Kester D.E. 1985. Propagación de Plantas: principios y prácticas. C.E.C.S.A. Quinta Reimpresión. México. D. F. México. 795 p.

Hartman, H.T., Kester D.E., Davies F.T. Jr. y Geneve R.L. 2002. Plant Propagation: Principles and practices. 7th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 880 p.

Hernández, Y. y González M. 2010. Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4): 58-69.

Holdridge, L.R., Poveda L.J. y Jiménez Q. 1997. Árboles de Costa Rica, vol. 1. Centro Científico Tropical: San José.

Hurtado, D. y Merino M. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Edit. Trillas. México.

Husen, A. y M. Pal. 2003. Effect of serial bud and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn. F. *Silvae Genetica*, 52 (2): pp. 83-88.

Husen, A. 2004. Clonal propagation of *Dalbergia sisso* Roxb. By softwood nodal cuttings: Effects of genotypes, application of IBA and position of cuttings o shoots. *Silvae Genetica* 53(2):pp.50-55.

ILDIS, 2005. International Legume Database & Information Service available at:<http://www.ildis.org/LegumeWeb?version~10.01&LegumeWeb&tno~158&genus~Albizia&species~saman#151>.

Joublan, M.J.P., Berti D., Wilckens M.E., Serri R.G.H. y Feliz O. 1998. Propagación vegetativa en falso espinó (*Hippophae rhamnoides* Juss). *Agronomía Sur*, 26(1):36-41.

Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades y preparación. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, W., y Mroginski, L. (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Cali. pp. 41-59.

Krikorian, A. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant hormones physiology biochemistry and molecular biology*. (Davies P.J., Ed.). Kluwer Academic Publishers. pp. 774-796.

Krikorian, A.D. 2005. Totipotency and proof of the concept. En: *The Journey of a Single Cell to a Whole Plant* (S.J. Murch y P.K. Saxena (eds.), Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire. p.1-36

Kyte, L. 1987. *Plants from test tubes an introduction to micropropagation*. Portland, Oregon, Timber Press. 160 p.

Kyte, L. y Kleyn J. 1996. *Plants from test tubes:an introduction to micropropagation*. 3ª ed. U.S.A. Portland: Timber Press. 240 p.

Lascuráin, M., Sánchez O., Luna V. e Iglesias C. 2009. Adquisición, ingreso y manejo de material vegetal en un jardín botánico, en M. Lascuráin, O. Gómez, O. Sánchez y

C.C. Hernández (eds.), Jardines botánicos, conceptos, operación y manejo. Asociación Mexicana de Jardines Botánicos, A.C., pp. 121-127.

Lewis, G. 2005. Legumes of the world. (Leg World), 327 p.

Ling Wang, X. y Zhong Z., 2012. Seasonal variation in rooting of the cuttings from Tetraploid Locust in relation to nutrients and endogenous plant hormones of the shoot. Turk J. Agric. For., 36:257-266.

Loh, C.S. y Rao A.N. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedling and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Hort., 39: 31-39.

López-Antonio, Y. 2013. Micropropagación de muicle (*Justicia spicigera* Schlecht. et Schltld.:Acanthaceae) por cultivo de yemas apicales y axilares. Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 57 p.

Mabberley, D.J. 1987. The plant book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. 706 pp.

Magallanes-Cedeño, 2004. Aplicación de la tecnología del cultivo *in vitro* en la propagación de especies forestales. Manejo de recursos forestales (Vargas H.J., Bermejo V.B., Ledig F.T., Eds.), 2ª. Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. Capítulo 13, pp. 177-185.

Martínez-Sotres, C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quñones J.G., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R. 2012. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration & Biodegradation, 69, 69:38-40.

Marquínez, J. 1998. Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (*Vallea stipularis*). Bogotá. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. CAR. 83 p.

McClelland, M.T. y Smith M.A.L. 1993. Alternative methods for sterilization and cutting disinfestations. International Plant Propagators Society, 43: 526-531.

McVaugh, R. 1987. Flora Novo-Galiciana. Vol.5, Leguminosae. The Univ. of Michigan Press. Ann. Arboretum. 786 p.

Merino, P.L. 1994. Procesos de uso y gestión de los recursos naturales-comunes. Instituto de Investigaciones Sociales, UNAM. 25 p.

Mundo Forestal 2002. www.elmundoforestal.com/elcorazon/cocobolo/cocobolo.html. 15/10/2014.

Muñoz-Flores, J., Orozco G.G., García Magaña J., Coria A.V.M., Salgado G.R. y Santiago S.M.R. 2011. Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae) .Rev. Mex. Cien. For., 2(3): 13-22.

Murashige, T. y Skoog T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15:473-497.

Ndoye, M., Diallo I. y Gassama-Dia Y. 2003. *In vitro* multiplication of the semiarid forest tree *Balanites aegyptiaca* L. *African Journal of Biotechnology*, 2(11):421-424.

Orea, D. y Villalobos V. 1990. Micropropagación de especies forestales. En fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de Tejidos Vegetales. Estudio FAO. Producción y protección vegetal, Roma, Italia.

Park, Y.S. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.*, 59: 651-656.

Pérez-Molphe, B.E., Ramírez M.R., Núñez P.H.G. y Ochoa A.N. 1999. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales para la conservación de germoplasma. En: Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. FOMES 97-1-5. pp. 129-134.

Pérez-Ponce, J.N. 1998. Propagación y Mejoramiento Genético de Plantas por Biotecnología de las Plantas. 5to. Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Libro de reportes. Santa Clara, Cuba. pp. 25-31.

Pérez, P. y Jiménez G.E. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*. En: Conferencias en biotecnología agrícola. pp. 1-10.

Pierik, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. 3a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 113 p.

Pradhan, C., Kar S., Pattnaik S. y Chand P.K. 1998. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.*, 18:122-126.

Puddephat, I., Alderson P. y Wright N. 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 48: 951-962.

Roca, W. y Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia. CIAT. Parte A, Cap. 1, pp. 1-18.

Rossi, L. 2003. Cultivo *in vitro*. Fotosíntesis reseña histórica. Recuperado el 26/05/13 de: www.upch.edu.pe/facien/fc/dcbf/bioaplicada/CULTIVO%20IN%20VITRO.ppt

Rost, Th.L., Barbour M.G., Stocking C.R. y Murphy T.M. 1998. Plant Biology. Ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, CA.

Ruíz-Solsol, H. y Mesén F. 2010. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de Sancha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Agronomía Costarricense* 34(2): 259-267.

Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). 1406 pp.

Rzedowski, J. y Rzedowski G.C., 2003. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 112. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Salisbury, F. y Ross C. 1994. Fisiología vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. México. D.F. 759 p.

Sánchez, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.

SEMARNAT, 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Jueves 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México.

Singh, A.K., Chand S., Pattnaik S. y Chand P.K. 2002. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber yielding tree legume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 203-209.

Singh, B., Yadav R. y Bhatt B.P. 2012. Vegetative propagation of *Dalbergia sissoo*: effect of growth regulators,length,position of shoot and type of cuttings on rooting potential in stem cuttings. *Stud. China*, 14(3): 187-192.

Sreedevi, E., Pullaiah T. y Kishor P. 1999. In vitro plantlet regeneration from seedling explants of *Dalbergia paniculata* Roxb. En: *Pant tissue culture and biotechnology: emerging trends. Proceedings of a symposium held at Hyderabad, Universities, Hyderabad, India.* pp. 112-117.

Suárez, F. 2011. Micropropagación in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.

Sutton, W.R.J. 1999. Does the world need planted forests? *New Zealand J. For.*, 44: 24-29.

Tchoundjeu, Z. y Leakey R.R.B. 2000. Effects of stockplant flushing cycle, auxin and leaf area on carbohydrate and nutrient dynamics of cuttings. *Journal of Tropical Forest Science*, 12: 77-91.

Thorpe, T. y Blondi F. 1982. Conifers. En: *Handbook of plant cell culture*. Vol 2. Crop species (Sharp, W.R., Evans. D.A. Amirato P. V., Yamada Y., Eds.) MacMillan, New York. pp. 435-470.

Tisserat, B. 1999. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: *Plant Cell Culture: A Practical Approach* (Dixon R.A., Ed.). IRL Press, Oxford, pp. 79-105.

Tuchán, R.J.L., 2009. Efecto de cuatro enraizantes comerciales en plántulas del piñón (*Jatropha curcas* L.) bajo condiciones naturales y de invernadero. Tesis de Licenciatura Ingeniero Agrónomo. Zamorano Honduras. 20 pp.

Valverde, L. y Alvarado L. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 52: 41-46.

Vásquez, C., Orozco A. Rojas M., Sánchez M., Cervantes V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemas. Fondo de Cultura Económica, México D.F., México. 167 pp.

Villa-Castorena, M., Catalán-Valencia E.A., Inzunza-Ibarra M.A., González-López M. de L. y Arreola-Ávila J.G. 2010. Producción de plántulas de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) mediante estacas. *Ciencias Forestales y del Ambiente*, 16(1): 37-47.

Villalobos, A.V. 1990. Organogénesis. En: *Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales* (Rosell C. y Villalobos V., Eds.). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma.

Villalobos-Arámbula, A.V. 1994. Historia del cultivo de tejidos. En: *Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales* (Rossell C.H. y Villalobos A.V.M., Eds). FAO, 105:3-7.

Villalobos V. M. y Engelmann F. 1995. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 375-382.

Villalobos, A.V.M. y Thorpe V.T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (Roca W.M. y Mroginski L.A., Eds.) CIAT, Cali, Colombia. pp. 6-32.

Villamizar, E. 2005. Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y de Rodamonte (*Escallonia myrtilloides*) en el

laboratorio de cultivos de tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá.
Universidad Francisco de Paula Santander.

Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz J.M., Atrián-Mendoza E., Hernández-García A., Granados-García M.E., García-Magaña J., Salgado-Garciglia R. y Sánchez-Vargas N.M. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). Polibotánica, 38: 129-144.