



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA
“PRESIDENTE JUÁREZ”

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

“ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN
Arbutus xalapensis KUNTH”

TESIS

QUE PRESENTA

VIOLETA TOVAR ROCHA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. PATRICIA DELGADO VALERIO**

CO-DIRECTORA DE TESIS: **DRA. MA. DEL CARMEN ROCHA GRANADOS**

URUAPAN, MICHOACÁN, AGOSTO DE 2012.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
**Programa Institucional de Maestría en Ciencias
Biológicas**

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN *Arbutus xalapensis* KUNTH" presentada por la ING. VIOLETA TOVAR ROCHA, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morcia, Michoacán, a 13 de agosto de 2012

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Patricia Delgado Valerio

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

Dra. Ana Trizqui Chávez Bárcenas

Dr. Alejandro Martínez Palacios

Dr. Nefelí Ochoa Alejo

DEDICATORIAS

A mis padres, el Sr. Gerardo Tovar Belmúdez y la Sra. Ma. Elena Rocha Granados. Por su infinito amor y estar a mi lado en todo momento, por brindarme todo su apoyo, consejos y comprensión. Por darme todas las herramientas y valores necesarios para hacer de mí una mejor persona y profesionista. Los amo, son unos padres excepcionales y ejemplares; ¡mil gracias por todo, que Dios los bendiga siempre!

A la memoria de mis queridos abuelos: el Sr. Gerardo Tovar León⁺, la Sra. Juana Belmúdez León⁺ y el Sr. J. Jesús Rocha Granados⁺; por todos los bellos momentos que compartimos, Dios los tenga en su gloria. A mi abuelita, la Sra. Guadalupe Granados Martínez por brindarme todo su amor, consejos y sabiduría.

A mis hermanos, Julio César y Rocío Selene Tovar Rocha. Por tanto cariño, cuidados, comprensión y consejos; por ser mis mejores amigos y compartir juntos tantos momentos de dicha y apoyarme a salir adelante de aquellos días difíciles. ¡Siempre tendrán un lugar muy especial en mi corazón! A mis lindas sobrinas, Ayari Selene y Ariadna Sofía, por ser la alegría de la casa de los abuelos en cada visita y llenarla de alegría, por enseñarme que la vida es el juego más hermoso al que uno está invitado todos los días y que hay que esforzarse por dar lo mejor.

A mi esposo, el Ing. Ramiro Iván Alejandro Ledesma. Por su inmenso amor, comprensión y apoyo, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y ser mi fuerza para levantarme. Por brindarme todos sus cuidados y consejos, por compartir juntos tanta felicidad y por todos los maravillosos anhelos que aún quedan por cumplir. Por ser mi motor y esforzarme para ser mejor persona. ¡Muchas gracias por ser parte de mi vida, te amo!

A las familias Tovar Belmúdez y Rocha Granados. Por todo su cariño, apoyo y consejos y por los momentos tan gratos que hemos compartido como la gran familia que somos.

Violeta Tovar Rocha

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH. Por brindarme la oportunidad de mejorar mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por el apoyo económico otorgado a través de la beca 239177 para la realización del presente trabajo.

Al Programa de Mejoramiento del Profesor (PROMEP-SEP) y a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la UMSNH, por el apoyo recibido a través de los proyectos PTC-292 y CIC-2011 de la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados.

A mi Directora de tesis, la Dra. Patricia Delgado Valerio y Co-Directora, la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados. Por brindarme su tiempo, paciencia, apoyo y valiosos consejos, así como todos los conocimientos y herramientas necesarias para la realización de este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas, Dr. Alejandro Martínez Palacios y Dr. Neftalí Ochoa Alejo. Por su tiempo, revisión, consejos y contribuciones para la redacción del presente trabajo.

A mis profesores de posgrado. Por proporcionarme todas las bases necesarias, sus conocimientos y experiencia durante mi formación como Maestra en Ciencias.

Al Laboratorio de Interacción Planta-Ambiente de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, a cargo de la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas. Por el apoyo recibido para la realización experimental del presente trabajo.

A la Dra. Blanca Nieves Lara Chávez y la M. C. Teresita Ávila Val, del Laboratorio de Fitopatología Vegetal; al Dr. José Luciano Morales y la Srita. Fany, del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Por los consejos y las facilidades otorgadas para la toma de fotografías del presente trabajo.

Al M. C. Julio César Tovar Rocha. Por su valioso apoyo en la realización de los análisis estadísticos del presente trabajo.

A la familia Gómez Santoyo, por su buena voluntad y todo el apoyo que me brindaron cuando lo necesité.

A todas las personas que directa e indirectamente apoyaron en la realización de este proyecto; así como a mis compañeros de generación y área temática: Lénica, Selene, Lía y Mario por su apoyo y por todo lo que compartimos como compañeros en este andar como estudiantes de posgrado.

A la Secretaria del Dpto. de Posgrado de Biología, Patricia Liliana Cerritos Barriga. Por su valioso apoyo y facilidades otorgadas en la realización de todos los trámites administrativos del posgrado.

Violeta Tovar Rocha

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
I. RESUMEN GENERAL.....	vi
II. SUMMARY.....	viii
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.....	14
V. OBJETIVOS.....	15
VI. RESULTADOS.....	16
CAPÍTULO I. ESTADOS DE MADURACIÓN DE FRUTOS DE <i>Arbutus xalapensis</i> KUNTH, Y SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE SEMILLAS Y EMBRIONES CIGÓTICOS.....	16
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	27
LITERATURA CITADA.....	28
CAPÍTULO II. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y BRASINOLIDO EN LA GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE MADROÑO (<i>Arbutus xalapensis</i> KUNTH).....	31
RESUMEN.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUCCIÓN.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36

CONCLUSIONES.....	39
LITERATURA CITADA.....	40
 CAPÍTULO III. ORGANOGÉNESIS EN MADROÑO (<i>Arbutus xalapensis</i> KUNTH).....	43
RESUMEN.....	43
ABSTRACT.....	43
INTRODUCCIÓN.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	49
LITERATURA CITADA.....	49
 CAPÍTULO IV. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN MADROÑO (<i>Arbutus</i> <i>xalapensis</i> KUNTH).....	52
RESUMEN.....	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUCCIÓN.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
RESULTADOS	56
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	61
LITERATURA CITADA.....	61
VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	65
VIII. RECOMENDACIONES.....	72
IX. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	73

LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Estados de desarrollo de los frutos de <i>A.xalapensis</i> Kunth según su tamaño (mm) y peso (g).....	23
CUADRO 2. Valores medios para relacionar los tres grupos de madurez con tamaño (mm) y peso (g) del fruto <i>A. xalapensis</i> Kunth.....	23
CUADRO 3. Composición de los medios de cultivo utilizados.....	35
CUADRO 4. Efecto del medio de cultivo y concentración de brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth.....	38
CUADRO 5. Efecto de la combinación de las diferentes concentraciones de BA con ANA sobre la formación de brotes, formación de callos (superior derecha) y diámetro de callo (inferior centro).....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth: 1) San Miguel Charahuén (Mpio.de Pátzcuaro), y 2) San Jerónimo (Mpio. de Quiroga).....	20
FIGURA 2. Clasificación de los estados de maduración de los frutos de madroño según su coloración. 1 al 6: frutos verde oscuro (FVO) o frutos inmaduros; 7 y 8: frutos verde-amarillo (FVA) o frutos intermedios; y 9 y 10: frutos naranja-rojizo (FNR) o frutos maduros.....	22
FIGURA 3. Estados de madurez del fruto de madroño del 1 al 10 (a), y observación microscópica de los frutos (b), semilla (c) y embriones (d) a un aumento de 4X (estados 1-4) y 2X (estados 5-10).....	24
FIGURA 4. Influencia del estado de madurez del fruto: frutos verde obscuro (FVO), frutos verde-amarillo (FVA) y frutos naranja-rojo (FNR), sobre la germinación de semillas de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth a los 30 días de su establecimiento en medio MS básico.....	26
FIGURA 5. Germinación de semilla y embriones cigóticos de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth a los 30 días de su establecimiento en medio básico MS.....	27
FIGURA 6. Germinación de embriones cigóticos de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth después de 30 días de su cultivo en tres diferentes medios.....	37
FIGURA 7. Efecto del brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de <i>Arbutus xalapensis</i> Kunth en tres medios de cultivo con brasinolido a los 30 días después de su establecimiento <i>in vitro</i>	39
FIGURA 8. Respuestas morfogénicas de cotiledones de madroño cultivados en medio WPM bajo distintas combinaciones de BA con ANA (mg.L ⁻¹) en relación a la formación de brotes, callo y diámetro de callo.....	47
FIGURA 9. Respuestas morfogénicas de cotiledones de madroño cultivados en un medio WPM bajo distintas combinaciones de BA, KIN y ANA (mg.L ⁻¹).....	48

FIGURA 10. Efecto de la concentración del 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L ⁻¹) y el medio de cultivo (MS), sobre la formación (izquierda) y crecimiento (derecha) de callo embriogénico en condiciones de oscuridad, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.....	57
FIGURA 11. Efecto de la concentración del 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L ⁻¹) y el medio de cultivo (WPM), sobre la formación (izquierda) y crecimiento (derecha) de callo embriogénico en condición de luz, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.....	57
FIGURA 12. Efecto de la concentración del 2,4-D y el medio de cultivo (WPM), sobre la formación (izquierda) y crecimiento de callo embriogénico (derecha), en condiciones de oscuridad, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.....	58
FIGURA 13. Efecto del 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L ⁻¹) sobre la inducción de tejido calloso de embriones cigóticos de madroño, bajo condiciones de luz y oscuridad en el medio WPM (Woody Plant Medium).....	58
FIGURA 14. Observaciones microscópicas de embriones somáticos de madroño presentando los estados: globular (G), corazón (C) y torpedo (T); observados a un aumento de 10 X y con filtros de luz blanca (costados) y amarilla (centro).....	59

I. RESUMEN GENERAL

Dentro de las especies forestales de importancia maderable y económica, se encuentra *Arbutus xalapensis* Kunth (madroño), la cual es muy apreciada por los artesanos del Estado de Michoacán debido al color, brillo y veteado de su madera, para la fabricación de artesanías, artículos torneados (chapa, muebles, decoración de interiores) y obtención de carbón.

México es un país con abundante riqueza forestal; sin embargo, la deforestación y tala inmoderada, las prácticas agropecuarias, el cambio climático y los incendios entre otros factores, han contribuido a la pérdida de estos recursos nativos invaluable. Derivado de esta problemática, se hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan tanto la conservación de las especies como su rápida propagación y su fácil manejo. Entre estas técnicas, se encuentra el cultivo de tejidos vegetales, motivo de esta investigación.

En el presente trabajo de investigación se dan a conocer los avances logrados en el estudio de esta especie, en cuatro áreas distintas. En el capítulo I, se aborda la propuesta de una escala de clasificación del fruto de madroño en diez estados de madurez y se describe la realización de pruebas de germinación de la semilla y embriones cigóticos en medio MS básico sin reguladores. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a los embriones de mayor viabilidad para estudios posteriores de embriogénesis.

En el capítulo II, se hace referencia al efecto que tienen tres tipos de medio de cultivo (P889, MS y WPM) sobre la germinación de embriones de madroño, así como la adición de seis concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg.L⁻¹) de brasinolido (regulador de crecimiento). Los análisis indicaron que más que el regulador adicionado, es el medio de cultivo lo que influye mayormente sobre la germinación de los embriones cigóticos, obteniéndose el mayor porcentaje en el medio WPM sin regulador de crecimiento.

Respecto al capítulo III de esta investigación, trata el proceso de la organogénesis, para el cual (derivado de los resultados anteriores en cuanto al medio de cultivo más eficiente para esta especie) se cultivaron cotiledones en medio WPM suplementado con dos distintas

combinaciones de reguladores: la primera, BA (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹) con ANA (0, 0.1 y 0.5 mg.L⁻¹), y la segunda: BA (0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹) con KIN (0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹) y ANA (0 y 0.5 mg.L⁻¹). Sólo en la primera combinación, utilizando 8 mg.L⁻¹ de BA con 0.5 mg.L⁻¹ de ANA, se logró la inducción de callo, mientras que en la segunda combinación (BA con KIN y ANA, en cualquiera de sus combinaciones) se produjo muy poco callo y una gran cantidad de raíces, sin que se lograra la formación de brotes adventicios (organogénesis directa) a partir de cotiledones.

Finalmente, el capítulo IV está dedicado al proceso de embriogénesis somática. Una vez que se tuvo el conocimiento sobre los embriones con viabilidad morfogénica de *Arbutus xalapensis* Kunth, se procedió a sembrar embriones cigóticos en el medio MS y/o WPM adicionados con diferentes concentraciones de 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹), bajo condiciones de luz y oscuridad, para inducir el proceso de embriogénesis somática. Los resultados muestran que el mejor medio de cultivo para este fin fue el WPM suplementado con 2 mg.L⁻¹ del regulador bajo condición de luz; mientras que en oscuridad, sólo fue necesaria la adición de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D para producir masas embriogénicas, lo cual se corroboró mediante un análisis de microscopía en el que se observaron estas masas y se verificó la presencia de embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo: globular, corazón y torpedo.

II. SUMMARY

Among the forest species of economic importance and timber, is *Arbutus xalapensis* Kunth (strawberry tree), which is highly prized by artisans of the Michoacán state because of the color, brightness and grain of the wood for the manufacture of handicrafts, turnery (veneer, furniture, interior decoration) and procurement of coal.

Mexico is a country with abundant forest resources, however, deforestation and excessive logging, farming practices, climate change and fire, among other factors, have contributed to the loss of these valuable native resources. Due to this problem, the development of techniques for both the conservation of species and its rapid propagation and easy handling, it is necessary. Among these techniques, is the *in vitro* culture of tissue plant, the reason for this research.

In this paper are given about the progress made in the study of this species in four different areas. Chapter I deals with the proposal of a rating scale of strawberry tree fruit in ten states of maturity, and seed germination and zygotic embryos were tested on MS medium without regulators core. The results allowed selecting the most viable embryos for subsequent studies of somatic embryogenesis.

Chapter II, refers to effect having three types of culture medium (P889, MS and WPM) on the germination of embryos of mature fruits of strawberry tree, as well as the addition of six concentrations (0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg.L⁻¹) of brassinolide (growth regulator). Analyses indicated that rather than the regulator added, is the medium that influences mostly on the germination of the embryos, yielding the highest percentage in WPM medium.

For Chapter III, the organogenic process was studied. Having known which medium is the most efficient for this species, cotyledon explants were cultured on WPM medium supplemented with two different combinations of growth regulators: the first, BA (0, 1, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹) with NAA (0, 0.1 and 0.5 mg.L⁻¹), and the second: BA (0, 0.5, 1 and 2 mg.L⁻¹) with KIN (0.5, 1 and 2 mg.L⁻¹) and NAA (0 and 0.5 mg.L⁻¹). Only in the first combination

where were used 8 mg.L⁻¹ of BA and 0.5 mg.L⁻¹ of NAA was achieved callus induction, whereas in the second combination (KIN, BA and NAA, in any combination thereof) there was very little callus growth and a lot of roots; however, the adventitious shoots (directed organogenesis) were not activated from cotyledons.

Finally, Chapter IV is devoted to the process of somatic embryogenesis. Once it had the knowledge on morphogenetic viability of *Arbutus xalapensis* Kunth embryos, proceeded to culture zygotic embryos on MS and WPM medium added with different concentrations of 2,4-D (0, 1, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹) under conditions of light and darkness, to induce somatic embryogenesis process. The results showed that the best medium for this purpose was WPM medium supplemented with 2 mg.L⁻¹ of the regulator under light conditions, while in darkness it was necessary only the addition of 1 mg.L⁻¹ of 2,4-D to produce embryogenic masses, which was confirmed by microscopy analysis in which these masses were observed and verified the presence of somatic embryos at different development stages: globular, heart and torpedo.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es un país que cuenta con una gran diversidad de ecosistemas forestales naturales, tan sólo 64.5 millones de hectáreas en México están cubiertas de bosques y selvas, representando el 33% del territorio nacional, lo que lo ubica a nivel mundial como uno de los países con mayor riqueza natural. Estos bosques tienen un alto valor de biodiversidad, producen numerosos beneficios económicos y son críticos para el bienestar de muchas comunidades, depositarias de conocimientos ancestrales sobre sus recursos naturales (Ybarra 2007). Dentro del país, se tiene que el 81% de la producción forestal se localiza en cinco entidades federativas: Durango (31%), Chihuahua (21%), Michoacán (17%), Oaxaca (7%) y Jalisco (6%) (CIDEIBER 1998).

En este contexto, Michoacán cuenta con varias especies endémicas de clima tropical con mayor potencial maderable y de importancia comercial exótica como: cedro rojo (*Cedrela odorata*), el cóbano (*Swietenia humilis*) y la parota (*Enterolobium cyclocarpum*) principalmente. En cuanto a las especies de clima templado-frío con características maderables deseadas se encuentran varias especies de pinos (*Pinus greggi*, *P. patula* y *P. pseudostrobus*), así como el fresno (*Fraxinus uhdei*), madroño (*Arbutus* spp.) y el aile (*Alnus* spp.) (Comisión Forestal del Estado de Michoacán, enero de 2006).

Los bosques de clima templado-frío, están compuestos por especies de coníferas y latifoliadas que prosperan en un rango de 500 a 3,500 m sobre el nivel del mar. Las formaciones o asociaciones vegetales que componen este tipo de vegetación son los bosques de pino, bosques de oyamel, bosques mezclados (pino-encino) y los bosques de encino. Las especies de mayor importancia, por su valor comercial y distribución, son las correspondientes al género *Pinus*, en donde se encuentran las siguientes especies: *Pinus pseudostrobus* (cantzimbo), *P. douglasiana* (pino lacio), *P. michoacana* (pino escobetón) y *P. oocarpa* (pino trompillo). Otras especies de latifoliadas que se pueden encontrar asociadas a los bosques de encino (*Quercus* spp.) o bosques mezclados con pinos son: *Alnus* sp. (aile), *Arbutus* sp. (madroño) y *Populus* sp. (álamo) (CIDEIBER 1998).

Michoacán es una región maderera reconocida a nivel nacional, en donde debido a su orografía y condiciones climáticas, se puede encontrar una gran variedad de especies forestales endémicas del estado, cuya madera es utilizada en la producción de muebles, comprimidos, aserrín, carbón, así como en la elaboración de puertas, ventanas, pisos, instrumentos musicales, artículos de oficina y cocina y, de manera importante, en la elaboración de artesanías como bateas, máscaras, baúles, juguetes, llaveros, joyería, esculturas y juegos de salón; tradición que los artesanos michoacanos han practicado desde tiempos remotos, y que actualmente es fuente de ingresos para una gran parte de la población (Rzedowski y Calderón 1985, Pérez 1993).

Una de las problemáticas más grandes que enfrentan los artesanos en relación al uso de estas maderas nativas de la región, ha sido la rápida disminución e inclusive la desaparición de varias especies y poblaciones forestales nativas (pérdida de la diversidad genética), causada principalmente por la deforestación (tala y quema de los bosques), la apertura de nuevas áreas con fines agrícolas y/o frutícolas (cambio de uso del suelo), el sobrepastoreo y las plagas forestales (ambos inciden en la pobre producción de frutos y semillas) (IPCC 2001, Ponce-Mendoza *et al.* 2006, INAFED 2009). Adicionalmente, la contaminación atmosférica impacta de manera importante en distintas escalas espaciales, con emisiones y deposiciones atmosféricas considerables a nivel global, lo que conlleva a que los ciclos biogeoquímicos e hidrológicos sean modificados e influyan también en esta problemática. Antecedentes respecto de los cambios climáticos globales observados para las últimas décadas, reflejan una evidente disminución de las precipitaciones para extensas áreas en el planeta (Etchevers *et al.* 2006). A nivel mundial, existe una preocupación creciente por el cambio global y la sobre utilización de los recursos naturales renovables (Gómez *et al.* 2006). En nuestro país, uno de los problemas es la constante pérdida de especies vegetales por la sobreexplotación, la sustitución de los bosques por la práctica del monocultivo (con la consecuente degradación de éste y su erosión en la mayoría de las áreas agrícolas de México, lo que conlleva a una pérdida en la productividad) la contaminación del agua y aire, la destrucción del hábitat y la introducción de especies exóticas son algunos de los factores que han propiciado la extinción de un gran número de especies (CONAFOR 2002, Etchevers *et al.* 2006).

Por lo tanto, es innegable que muchas de las especies forestales de importancia ecológica y económica de Michoacán, se encuentran en peligro de extinción: como el aile (*Alnus arguta* Schltl. Spach, especie insustituible usada para la elaboración de las tradicionales bateas de Michoacán, decoradas al maque e incrustado; el cirimo (*Tilia mexicana* Schltl.) y el granadillo (*Platymiscium lasiocarpum* Sandw.), que se usan y aprecian para la elaboración de guitarras, y el madroño (*Arbutus xalapensis* Kunth) empleado en la fabricación de artículos torneados (Guridi 1980, Rzedowski y Calderón 1985, Pérez 1993, Rzedowski 2006).

El madroño es una especie con importancia ecológica y económica, la cual hasta el momento ha sido poco investigada (Ramírez *et al.* 2004) y con problemas de amenaza (CONAFOR 2002, Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001). Su principal producto es la madera, muy apreciada para la fabricación de artesanías como ensaladeras, dulceros, especieros, floreros, platos, saleros, juguetes, cofres, licoreras, etc. La madera se recomienda para la fabricación de chapas, muebles, decoración de interiores y obtención de carbón, su corteza contiene tanino y se utiliza para curtir pieles. La infusión que se obtiene de su cocimiento se emplea en medicina casera como astringente en casos de diarrea (CONAFOR 2002). En algunos lugares se cultiva como planta de sombra y ornato en parques y jardines por la belleza de sus flores blancas y por lo atractivo de sus pequeños frutos rojos. Estos frutos son recolectados y vendidos en los diferentes tianguis y mercados de distintas ciudades de Michoacán, para la alimentación de aves canoras en cautiverio.

Descripción, distribución y taxonomía del género *Arbutus*

Existen alrededor de unas 20 especies distribuidas en México, Estados Unidos y la región mediterránea. En el valle de México se encuentran 2 especies muy afines, que según algunos autores corresponden a una sola: *Arbutus xalapensis* Kunth (madroño) (Rzedowski y Calderón 1985).

Pertenece a la familia Ericaceae. Es un árbol de 10 a 20 metros de altura, perennifolio; cuyo tronco y ramas, poseen corteza amarillento-rojiza, delgada, lisa y frecuentemente exfoliante; hojas alternas, persistentes, pecioladas, enteras o aserradas, coriáceas; panículas terminales; cáliz de 5 lóbulos; corola urceolada, pentalobada; 10 estambres, incluso, filamentos dilatados

hacia la base, anteras con dos apéndices dorsales y dirigidos hacia abajo con dehiscencia poricida; ovario súpero, 5-locular, con numerosos óvulos en cada lóculo, estilo columnar, estigma entero, baya globosa, con el pericarpio granular, 5-locular y con varias semillas.

Su clasificación taxonómica (Missouri Botanical Garden 2012) es la siguiente:

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

División: Anthophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnolidae

Superorden: Asteranae

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Género: *Arbutus*

Especie: *A. xalapensis*

Se distribuye por los estados de Chihuahua, Nuevo León, Durango, Sinaloa, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Forma parte del matorral xerófilo, de los bosques de *Quercus* y confieras. Requiere suelo que retenga humedad, bien drenado, rico en materia orgánica, libre de cal, en sol o semi-sombra y al abrigo de los vientos fríos, especialmente cuando joven. Las plantas no son robustas en las áreas más frías del país, tolerando temperaturas abajo de -10 °C (Niembro-Rocas 1986). En el estado de Michoacán, el madroño se distribuye por los municipios de Acuitzio, Angangeo, Buena Vista, Charo, Cherán, Chilchota, Coalcomán, Coeneo, Erongarícuaro, Gabriel Zamora, Hidalgo, Jiménez, La Huacana, Los Reyes, Madero, Morelia, Nahuatzen, Paracho, Pátzcuaro, Purépero, Quiroga, Salvador Escalante, Susupuato, Tacámbaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tingambato, Tlalpujahua, Tzintzuntzan, Uruapan, Zacapu, Zinapécuaro y Zitácuaro (Díaz y Bello 1993, Rodríguez y Espinosa 1996).

Conservación de germoplasma

La conservación de germoplasma es un procedimiento utilizado para almacenar especies a través de bancos (*ex situ* o *in situ*), de tal forma que se asegura la sobrevivencia de aquellos genotipos que posean características adecuadas para realizar estudios de mejoramiento genético (Banerjee y De Langhe 1985, Usher 1973, Whithers 1985). Muchas especies se pueden conservar mediante el almacenamiento de semilla botánica (sexual y verdadera); sin embargo, algunas especies presentan una fuerte heterocigosidad y diferentes grados de esterilidad (López *et al.* 1985). El incremento en la calidad y producción de alimentos, depende de la protección y eficaz utilización de estos recursos y ello exige su recolección, conservación, evaluación, documentación e intercambio (Esquinas 1981).

El objetivo de la conservación de germoplasma vegetal es mantener la diversidad genética en condiciones estables. Además, los altos rendimientos dependen de la disponibilidad de materiales genéticos adecuados para su mejoramiento. Esta situación muchas veces pasa desapercibida para los productores y el público en general. La pérdida de diversidad genética de las especies cultivadas, se considera como uno de los principales problemas ambientales (Plucknett y Williams 1992).

Las especies arbóreas con alta variabilidad genética, generalmente se hace a través de selecciones genéticas y entrecruzamientos con parientes o clones, aislándolos de las poblaciones silvestres. Los parientes silvestres también cambian lentamente, adaptándose a condiciones ambientales en su estado silvestre o en diferentes regiones. Debido a esto, es necesario conservar genotipos silvestres para mejoramiento de los cultivos y conservar su variabilidad genética (Hoyt 1992).

Aunque la diversidad genética de muchos cultivos ha sido bien preservada *ex situ*, muchos otros que son importantes a nivel nacional o local están pobremente representadas en las colecciones por varias razones. Por ejemplo, cultivos importantes como mango, caucho, coco, café y palma de aceite, producen semillas recalcitrantes incapaces de soportar desecación; para ello es importante idear nuevas técnicas que ayuden a su conservación (Villalobos-Arámbula y Engelmann 1995). En este sentido, se han desarrollado algunos sistemas de conservación de

germoplasma vegetal como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la micropropagación, el almacenamiento en condiciones de crecimiento mínimo y la criopreservación (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999).

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permite la propagación *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales bajo condiciones asépticas y en ambientes controlados de luz y temperatura, lo que permite tener en pequeños espacios una gran cantidad de especies vegetales (Hurtado y Merino 1987, Pérez Molphe Balch *et al.* 1999). Con el uso de estas técnicas, actualmente varios laboratorios de Francia y Canadá han emprendido grandes proyectos para la conservación y multiplicación *in vitro* de especies forestales nativas, poniéndolos a la vanguardia en los programas de conservación y mejoramiento genético de especies forestales (Park *et al.* 2006).

Conservación *in vitro*

Una alternativa a las colecciones de campo es el establecimiento *in vitro* de estas plantas bajo condiciones de crecimiento normales o limitadas. El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un periodo breve y la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas y en espacios pequeños; con garantía de sanidad y estabilidad genética, lo que facilita enormemente el intercambio internacional de germoplasma (Maruyama *et al.* 1996).

Control hormonal del crecimiento y desarrollo *in vitro*

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos. Dentro de éstos últimos se encuentran los llamados reguladores del crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999). Se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Actualmente se han aislado y estudiado otras sustancias fuera de estos grupos, que podrían ser consideradas como RCV, como por

ejemplo las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brasinoesteroides (Davies 1995, George *et al.* 2008).

Estos compuestos tienen gran importancia en campos como la agricultura y en el cultivo de tejidos vegetales, ya que mediante el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como la formación de tejido calloso (auxinas), brotes (citocininas), embriones somáticos (auxinas) y raíces. Por lo anterior, el correcto manejo de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema (Pérez Molphe Blach *et al.* 1999, Salisbury y Ross 1992).

Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y las citocininas, ya que son los que en gran medida regulan los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en los cultivos de tejidos vegetales. En menor grado se utilizan algunos reguladores no pertenecientes a estos grupos como las giberelinas y el ácido abscísico (George *et al.* 2008, Pérez Molphe Balch *et al.* 1999) y muy recientemente los brasinoesteroides, que son potentes reguladores vegetales (hormonas) con significativa actividad promotora de crecimiento. Son de naturaleza esteroide, siendo el brasinolido el primer compuesto aislado a partir de una fuente natural. Además también tienen influencia sobre otros procesos de desarrollo como germinación de semillas, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y maduración. También confieren resistencia a las plantas contra varios estreses abióticos (Cutler *et al.* 1991, Sasse 1997). Debido a sus múltiples funciones son considerados como hormonas vegetales con efectos pleiotrópicos (Sasse 1997).

Cultivo *in vitro* de madroño

En Michoacán, *Arbutus xalapensis* Kunth es una especie de gran importancia económica y artesanal que ha sido severamente explotada para su comercialización dentro y fuera del país, lo que ha llevado a que esta especie se encuentre en serios problemas de extinción local, llevando con ello al riesgo de su desaparición y a la pérdida de un recurso genético invaluable (CONAFOR 2002). Con lo mencionado, se hace patente el uso de técnicas biotecnológicas,

como el cultivo *in vitro*, que permitan su rápida proliferación y multiplicación en condiciones de laboratorio, y la preservación de dicha especie.

En lo referente al madroño, ésta es una especie, que junto con otras especies como el aile, granadillo y cirimo, hasta el momento no han sido trabajadas a nivel de laboratorio. Los reportes que se tienen de estas especies han sido a nivel de identificación botánica y manejo de recursos forestales. El madroño (*Arbutus xalapensis* Kunth y *A. glandulosa*) pertenecen a la familia Ericaceae, es una planta de importancia maderable en los estados de Chihuahua y Michoacán (Guridi 1980, Niembro-Rocas 1986). Su madera presenta excelentes cualidades y características para toda clase de artículos torneados, lo que ha hecho que en Michoacán sea un árbol muy apreciado por los artesanos de la región. Por desgracia, el madroño es uno de los árboles que en su hábitat natural no es abundante y rápidamente se ha agotado debido a su aprovechamiento intensivo como especie maderable y al cambio de uso de suelo para la apertura masiva de áreas agrícolas, ganaderas y para el aprovechamiento selectivo de especies forestales de diversos propósitos. Pero no sólo *Arbutus* se ha visto afectado en cuando a la reducción de su población, sino también especies como *Pinus* (pino), *Abies* (oyamel), *Quercus* (encino), *Tilia* (cirimo), *Garrya* (azulillo), *Clethra* (pacata) y *Alnus* (aile). A excepción de *Arbutus* y *Tilia*, las demás especies mantienen sus poblaciones en niveles no tan críticos; sin embargo, no deja de ser preocupante el grado de deterioro al que han estado siendo sometidas (CONAFOR 2002).

En nuestro país, poco se ha hecho en el campo del cultivo de tejidos vegetales de especies forestales de importancia maderable; los reportes que se tienen respecto a este tipo de tecnologías han sido, en su mayoría, con especies de pino. Sin embargo, hoy en día, el uso y aplicación de las nuevas herramientas biotecnológicas, ha permitido que un gran número de especies sean trabajadas a nivel de laboratorio, siendo uno de los principales objetivos el mejoramiento genético (Pullman *et al.* 2003a y b). La importancia de las especies forestales en países como Canadá, Finlandia, Alemania y Estados Unidos, entre otros, ha llevado a que los gobiernos de estos países inviertan en la construcción y equipamiento de laboratorios de propagación y mejoramiento de especies forestales de relevancia económica (Park *et al.* 2006), lo cual nos indica claramente que el futuro de la industria maderera, abastecida por muchas de

las especies forestales de las regiones boscosas de nuestro país, dependerá del rescate y subsecuente propagación *in vitro* de las especies más importantes para esta industria.

Organogénesis

El término organogénesis aplicado al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se refiere a la formación de órganos nuevos en los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar se encuentran las raíces y los brotes adventicios; éstos últimos son muy similares a una yema y tienen la capacidad de elongarse, producir raíz y así formar una nueva planta. El fenómeno de la organogénesis *in vitro* se basa en la llamada totipotencialidad celular, es decir, cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar funciones de cualquier órgano o tejido vegetal (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999).

La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primeramente se origina tejido calloso y luego se forman los órganos a partir de éste. De manera general, se sabe que bajo las condiciones adecuadas, ciertas células dentro de un explante comienzan a dividirse cambiando su estado de diferenciación y dando lugar a regiones llamadas meristemoides, los cuales, están compuestos por células pequeñas, isodiamétricas, de pared celular delgada, varias vacuolas periféricas pequeñas y un núcleo grande en posición central, lo cual corresponde a las características de las células meristemáticas comunes. Cada uno de estos meristemoides es capaz de desarrollarse para dar lugar a uno o varios brotes adventicios. El punto crítico en este proceso, es el momento en el que una célula dentro del explante comienza a dividirse para dar lugar al grupo de células que componen el meristemoide. A este proceso en concreto se le da el nombre de inducción, el cual es propiciado por los cambios cuantitativos en la disponibilidad de nutrientes y reguladores del crecimiento en una célula en particular, lo que induce a ésta a dividirse y formar el meristemoide (Hicks 1994).

Entre los factores que contribuyen a la inducción de los brotes adventicios destacan los reguladores de crecimiento, en particular, las citocininas y auxinas. En la mayoría de los casos, se ha visto que la organogénesis suele darse en presencia de altas concentraciones de citocinina y bajas de auxina (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999).

Diversas plantas de la familia Ericaceae han sido regeneradas *in vitro* vía organogénesis como es el caso del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), en el cual se llevaron a cabo estudios para determinar las condiciones óptimas para una alta eficiencia en la regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de brotes producidos *in vitro* de diferentes cultivares: Duke, Georgiagem, Sierra y Jersey. El máximo de brotes regenerados por explante ocurrió en un medio de regeneración con 7 mg.L⁻¹ de ribósido de zeatina [9-(-β-ribofuranosil)-6-(4-hidroxi-3-metil-but-2-anilamino) purina] y un flujo fotosintético (PPF) de 55 ± 5 μmol·m²·s⁻¹ (Cao y Hammerschlag 2000).

Ranyaphia *et al.* (2011) desarrollaron un protocolo para la regeneración de *Gaultheria fragrantissima* Wall vía organogénesis directa a partir de hojas, secciones de entrenudos (tallo sin yema axilar) y raíz de plántulas generadas *in vitro*. Estos explantes fueron cultivados en medio para rododendro modificado (MRM) adicionado con 1-2 mg.L⁻¹ de TDZ en el cual se obtuvieron brotes; posteriormente al adicionar 5.0 mg.L⁻¹ de 2iP al medio de desarrollo (MRM1/2), el número de brotes y la longitud de éstos aumentó en un periodo de ocho semanas. Después de dos meses, las plántulas generaron raíces y fueron transferidas a suelo de manera exitosa.

Álvarez *et al.* (2011) lograron la inducción de brotes de *Gmelina arborea* a partir de yemas obtenidas de árboles jóvenes, al utilizar el medio Schenk & Hildebrandt adicionado con 0.5 mg.L⁻¹ de BA; la formación de raíces fue producida al emplear 1.0 mg.L⁻¹ de ANA. La melina (*Gmelina arborea* roxb) es una especie leñosa, de gran interés comercial y ecológico debido a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera.

Embriogénesis somática

Una de las características más notables del cultivo de tejidos vegetales, es que ciertas células, y bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, tienen la capacidad de formar embriones mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica; a este proceso se le denomina embriogénesis somática. Los embriones somáticos, al igual que los cigóticos, tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la

diferencia de que es un proceso asexual, por lo que la nueva planta será exactamente igual a la planta madre (Thorpe 1995).

Para que una célula vegetal lleve a cabo el proceso de embriogénesis somática debe estar “determinada” o “inducida”. Debido a esto, las células capaces de formar embriones somáticos reciben el nombre de células embriogénicas determinadas (CED) o células proembriogénicas (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: la directa (ESD) y la indirecta (ESI). En la embriogénesis directa los embriones aparecen directamente sobre el explante original, mientras que en la indirecta el primer paso indispensable en este proceso es la obtención de tejido calloso o bien, la suspensión celular embriogénica a partir de la cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999).

A nivel biotecnológico, la embriogénesis somática ha sido una de las tecnologías más prominentes para la multiplicación de varios tipos de coníferas en los programas de mejoramiento e ingeniería genética, tecnología con la cual se puede obtener un incremento en la productividad, sustentabilidad y uniformidad de las plantas. Estas tecnologías han sido empleadas por países como Estados Unidos, Canadá y Francia (Park *et al.* 2006, Pullman *et al.* 2003a y b). Para la obtención de embriones somáticos se han utilizado como fuentes de explantes iniciales embriones cigóticos maduros e inmaduros, así como ápices de plantas adultas de varios tipos de pinos (Pullman *et al.* 2003b, Malabadi y Van 2005, Tang y Newton 2005, Lelu-Walter *et al.* 2006). Así, se ha observado que la adición al medio de cultivo de compuestos como el carbón activado, ácido abscísico y nitrato de plata favorecen la formación de los embriones (Pullman *et al.* 2003b, Malabadi y Van 2005, Lelu-Walter *et al.* 2006). La proliferación y germinación de los embriones somáticos de algunas especies de coníferas como *Pinus taeda*, *Pinus elliottii*, *Picea abies* y *Pseudotsuga menziessi*, se ve favorecida cuando se utilizan compuestos como el brasinolido (0.25 mg.L^{-1}), o el paclobutrazol (1 mg.L^{-1} ; un inhibidor de la síntesis de giberelinas), y se aplica una parcial deshidratación de los embriones por un periodo de 12 horas (Pullman *et al.* 2003b, Malabadi y Van 2005). Entre los

reguladores de crecimiento que más han sido utilizados para el establecimiento, regeneración, proliferación y enraizamiento de las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* se encuentran el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolacético (AIA), el tidiazurón (TDZ), la benciladenina (BA) y los brasinosteroides (específicamente el brasinolido) (Pullman *et al.* 2003b, Tang *et al.* 2004, Malabadi y Van 2005, Lelu-Walter *et al.* 2006, Park *et al.* 2006).

Se realizó un trabajo de propagación *in vitro* con especies de ericáceas de interés forestal: *Arbutus unedo* L., *Erica arborea* L., y *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boiss. y Reuter) Hand. Mazz., para establecer un método de germinación y enraizamiento pues presentan dificultades para germinar (mucho tiempo y bajo rendimiento), son de valor ecológico en el bosque mediterráneo esclerófilo y tienen posibilidades de uso industrial y en jardinería. En las tres especies se acortó notablemente el periodo de germinación (éste se produjo entre 10 y 60 días desde la siembra *in vitro*); para *A. unedo* se utilizó el medio MS 1/3 con 25 g.L⁻¹ de sacarosa, 20 mg.L⁻¹ de AG₃, 6 g.L⁻¹ de agar, pH 5.7; con una temperatura de 24±1 °C, 30 µEm⁻²s⁻¹ de iluminación y 16 h de fotoperiodo. Las semillas de *E. arborea* se sembraron del mismo modo, pero el medio sin AG₃ y en oscuridad; y las de *R. ponticum* subsp. *baeticum* en medio Anderson con 20 g.L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg.L⁻¹ de tiamina y 100 mg.L⁻¹ de inositol a pH 4.7. Los porcentajes de germinación fueron del 30, 50 y 97%, respectivamente. Posteriormente se realizó una propagación agámica, en la cual se cultivaron explantes uninodales (5-10 mm) en medio VID (Troncoso *et al.* 1990) con 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0.24 mg.L⁻¹ de ANA, 0.072 mg.L⁻¹ de BA en 6 g.L⁻¹ de agar y pH 5.7, bajo las mismas condiciones mencionadas antes. En este procedimiento, todos los explantes crecieron de manera adecuada en dicho medio, pero sólo formaron raíces *in vitro* los de *E. arborea*, mientras que los de *A. unedo* y *R. ponticum* subsp. *baeticum*, sólo enraizaron cuando fueron sometidos a inmersión en AIB (200 ppm para madroño y 500 ppm para rododendro, con porcentajes de 82 y 66% respectivamente) y se trasplantaron *ex vitro* con el método propuesto por Cantos *et al.* (1993).

Por su parte, Lauzer *et al.* (2000) usaron inflorescencias inmaduras de *Phragmites australis* para su propagación *in vitro* mediante embriogénesis somática. El más alto porcentaje de callo

embriogénico fue producido en un medio que contenía 1-2 mg.L⁻¹ de 2, 4-D con 100 mg.L⁻¹ de inositol. La regeneración de callo fue producida en medio MS libre de reguladores de crecimiento. Las plántulas producidas en este estudio, a través de la embriogénesis somática, no mostraron variación morfológica alguna como aquellas que se generan a partir de semilla.

IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

1. El desarrollo de los frutos de *Arbutus xalapensis* Kunth (madroño) está directamente relacionado con la madurez y coloración del mismo, y éste influye sobre la respuesta morfogénica *in vitro* de los embriones cigótico.
2. El tipo de medio de cultivo adicionado con brasinoesteroides aumenta la germinación de embriones cigóticos de madroño.
3. El tipo de medio cultivo y la combinación de auxinas y citocininas permite la inducción de organogénesis a partir de cotiledones de *A.xalapensis*, mientras que la adición de auxinas y las condiciones de luz y oscuridad, inducen el proceso de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de madroño.

V. OBJETIVOS

Generales

1. Determinar la morfología del desarrollo de los frutos, semillas y embriones cigóticos y el efecto de los brasinoesteroides sobre la germinación de semillas y embriones cigóticos de madroño (*A. xalapensis* Kunth).
2. Evaluar el medio de cultivo adecuado para el cultivo *in vitro* de madroño, así como el efecto de la combinación de auxinas y citocininas sobre la respuesta morfogénica de madroño.
3. Comparar el efecto de la luz y oscuridad sobre el proceso de embriogénesis somática de madroño.

Específicos

1. Determinar el estado de maduración del fruto con embriones cigóticos de viabilidad morfogénica *in vitro*.
2. Estudiar el efecto de tres diferentes medios de cultivo (889, MS y WPM) adicionados con diferentes concentraciones de brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de madroño.
3. Probar diferentes medios de cultivo y combinación de auxinas y citocininas para la inducción de organogénesis.
4. Comparar el efecto de la luz y oscuridad, y diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético en la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos.

VI. RESULTADOS

CAPÍTULO I

ESTADOS DE MADURACIÓN DE FRUTOS DE *Arbutus xalapensis* KUNTH, Y SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS Y EMBRIONES CIGÓTICOS

Violeta Tovar Rocha., Ma. del Carmen Rocha Granados, Patricia Delgado Valerio.
Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas S/N, Esq. Berlín. Col Viveros. C.P. 60190. Uruapan, Mich.
E-mail:crochag@yahoo.com.mx

RESUMEN

En este trabajo se determinó el efecto del estado de maduración del fruto en la germinación *in vitro* de semillas y embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunth. Se colectaron frutos de 10 árboles en cada uno de los dos sitios de estudio y se clasificaron de acuerdo con su tamaño y peso dentro de tres grupos caracterizados por el color del fruto: 1 al 6 frutos verde oscuro (FVO), 7 y 8 frutos verde-amarillo (FVA), y 9 y 10 frutos naranja-rojizo (FNR). De cada estado se seleccionaron 50 semillas y se colocaron en medio MS para evaluar su germinación. El experimento se repitió dos veces y los resultados fueron sometidos a un análisis de comparación de medias de Tukey el cual indicó que los tres grupos de frutos presentan características de peso fresco y diámetro diferentes ($P \leq 0.05$), con un promedio de 6.3 g y de 0.21 mm para FVO, 9.5 g y 0.46 mm para FVA y 10.8 g y 0.70 mm para FNR. El análisis de microscopía estereoscópica demostró que todos los estados de maduración presentan semillas y embriones; los estados 1 al 4 presentan embriones no desarrollados, y en los estados 5 al 10 los frutos contienen un mayor número de semillas con embriones desarrollados y con una mayor germinación (7.6 a 8.8). Se propone el uso de semillas provenientes de frutos de los estados de maduración del 7 al 10 para la germinación adecuada de semillas y embriones cigóticos de madroño.

Palabras clave: Madroño, clasificación de frutos, microcopia, embriones, semillas, germinación.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of fruit ripeness *in vitro* germination of seeds and zygotic embryos of strawberry tree (*Arbutus xalapensis* Kunth). Fruits were collected from 10 trees in each of the two study sites and were classified according to their size and weight in 10 states into three groups characterized by the color of the fruit: 1 to 6 dark green fruits (DGF), 7 and 8 yellow-green fruits (YGF) and 9 and 10 orange-red fruits (ORF). 50 seeds of each state were selected and placed on MS medium to evaluate their germination. The experiment was repeated two times and the results were submitted to Tukey's analysis of mean comparison which indicated that the three groups have different characteristics related to fresh weight and diameter ($P \leq 0.05$), with an average of 6.3 g and 0.21 mm for DGF, 9.5 g and 0.46 mm for YGF and 10.8 g and 0.70 mm for ORF. The stereomicroscopic analysis showed that all states have seed maturation and embryos; states 1 to 4 embryos have developed, and in the states 5 to 10, fruits contain a greater number of seeds with embryos developed and higher germination (7.6 to 8.8). Therefore, is proposed the use of ripening fruit from stages 7 to 10 for right germination of seeds and zygotic embryos of strawberry tree.

Keywords: Strawberry tree, classification of fruit, microscopy, embryos, seeds, germination.

INTRODUCCIÓN

Michoacán es una región maderera reconocida a nivel nacional por la elaboración de artesanías, la cual es una tradición que se ha practicado desde tiempos remotos y que actualmente es fuente de ingresos para una gran parte de su población (Rzedowski y Calderón 1985). Para dicha práctica se emplean especies como *Alnus arguta* Schltdl. Spach (aile), *Tilia mexicana* Schltdl. (cirimo) y *Platymiscium lasiocarpum* Sandw. (granadillo) que se aprecian y

usan para la confección de guitarras, y *Arbutus xalapensis* Kunth (madroño) la cual presenta excelentes cualidades para la fabricación de artículos torneados y/o artesanales (Guridi, 1981; Rzedowski, 1985; Rzedowski, 2006; Pérez, 1993; Comisión Forestal del Estado de Michoacán, 2009). *Arbutus xalapensis* pertenece a la familia Ericaceae, es un árbol de 10 a 20 metros de altura, perennifolio, cuyo tronco y ramas poseen corteza amarillento-rojiza, delgada, lisa y frecuentemente exfoliante, sus frutos son en forma de baya globosa con el pericarpio granular, 5-locular y con varias semillas (Hernández *et al.*, 1991). Se distribuye en los estados de Chihuahua, Nuevo León, Durango, Sinaloa, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Forma parte del matorral xerófilo, de los bosques de pino-encino o de encino solo (González y González, 1992). En el estado de Michoacán, el madroño se distribuye por los municipios de Acuitzio, Angangeo, Buena Vista, Charo, Cherán, Chilchota, Coalcomán, Coeneo, Erongarícuaro, Gabriel Zamora, Hidalgo, Jiménez, La Huacana, Los Reyes, Madero, Morelia, Nahuatzen, Paracho, Pátzcuaro, Purépero, Quiroga, Salvador Escalante, Susupuato, Tacámbaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tingambato, Tlalpujahua, Tzintzuntzan, Uruapan, Zacapu, Zinapécuaro y Zitácuaro (Díaz y Bello 1993, Rodríguez y Espinosa 1996). Sin embargo, actualmente sus poblaciones han disminuido y presentan una distribución restringida y fragmentada, lo cual ha sido originado por diferentes factores como son la sobreexplotación de su madera, el sobrepastoreo y la presencia de plagas forestales, y como consecuencia, se tiene una disminución en la producción de frutos y semillas, lo cual implica una baja regeneración y con ello la pérdida del material genético nativo de esta especie (INAFED, 2009). Por lo tanto, es de una importancia inmediata realizar estudios que permitan proponer metodologías de propagación vegetal eficientes para salvaguardar este recurso.

A pesar de que el madroño es una especie de importancia ecológica y económica, hasta el momento ha sido poco estudiada. Por ejemplo, se ha visto que en especies cercanamente relacionadas a madroño como *Arbutus unedo* L., se presentan problemas de germinación debido a que la pulpa del fruto contiene inhibidores (proteasas), que hacen que los frutos que caen al suelo permanezcan en él por un largo periodo hasta que se desintegran, y a menos de que las semillas sean separadas de la pulpa del fruto no germinan (Narbona *et al.*, 2003). Las plántulas que logran germinar no toleran el estrés por sequía durante el verano en sitios

expuestos, por lo que su establecimiento se restringe a zonas con una densa vegetación (Mesleard y Lepart, 1991). Para *A. xalapensis* Kunth no existen estudios que corroboren este comportamiento, siendo más estudiada a nivel de la calidad de la madera y sobre el efecto de los factores ambientales (temperatura y estrés hídrico) en su adaptabilidad y evolución (Aguilar y Barajas, 2005). Sólo existen dos estudios muy generales sobre el efecto que tiene la calidad de semilla o el grado de maduración del fruto sobre su germinación; uno de ellos es el de Nokes (1986), en donde señala que esta especie se multiplica mediante semilla fresca obtenida de frutos bien maduros con lo cual se asegura un alto porcentaje de germinación. Mientras que el segundo estudio es sobre reproducción asexual de *A. xalapensis* Kunth, la cual se logra utilizando estacas juveniles colocándolas en una cámara humedad a una temperatura de 24 a 28°C (Tipton, 1988). Un estudio reciente en donde se hace una clasificación de frutos es el realizado por Kaur y colaboradores (2009), quienes analizaron frutos de *Chlorophytum borivilianum* (planta herbácea originaria de la India) agrupándolos según su color y tamaño. Debido a la importancia que guarda el estado de desarrollo de los embriones cigóticos en estudios morfogénéticos *in vitro* de plantas leñosas, el objetivo de este trabajo fue determinar el estado óptimo de maduración del fruto de *Arbutus xalapensis* para la germinación *in vitro* de semilla y embriones cigóticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Se exploraron cuatro sitios en los Municipios de Uruapan, Pátzcuaro, Quiroga y Zacapu, de los que se seleccionaron dos sitios representativos de la especie con un mayor número de árboles maduros, reproductivos y con presencia de frutos. El primer sitio está ubicado cerca de la localidad de San Miguel Charahuén, municipio de Pátzcuaro (N 19°00'19.5" y W 101°51'05.2, altitud de 1990 msnm), el segundo sitio en San Jerónimo, municipio de Quiroga (N 19°41'46" y W 101°35'37.3", altitud de 2199 msnm) (Fig. 1). Los sitios pertenecen al bosque templado frío donde se encuentran principalmente *Pinus*, *Abies*, *Quercus*, *Cupressus*, *Alnus* y *Arbutus* (Rzedowski, 2006).



Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *Arbutus xalapensis*: 1) San Miguel Charahuén, Mpio. de Pátzcuaro, y 2) San Jerónimo, Mpio. de Quiroga Michoacán.

Material vegetativo

La colecta se realizó durante los meses de mayo a junio (2010 y 2011), periodo en el que el madroño está en su fase de fructificación. Se colectaron racimos de frutos en distintos estados de maduración de 10 árboles reproductivos para cada uno de los dos sitios. Los racimos fueron colocados en bolsas de papel estraza, etiquetándolas con el sitio y fecha de colecta, los cuales fueron almacenados en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH para su posterior procesamiento y análisis.

Desinfección de la semilla

Para la desinfección de las semillas se hicieron lavados de los frutos con jabón líquido y agua corriente, enseguida se colocaron en una solución con jabón en polvo más 1 g.L⁻¹ de Agrimicin® por espacio de 30 min en agitación, se enjuagaron con agua corriente y se procedió a su desinfección en una campana de flujo laminar. Los frutos fueron colocados en etanol al 70% por 45 segundos y posteriormente en una solución de agua destilada estéril adicionada con Tween 20 al 0.1% e hipoclorito de sodio (6% dilución comercial) al 40% por

30 min. Finalmente, se enjuagaron de 3 a 5 veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectados los frutos, se dejaron en agua destilada estéril durante 24 h, se extrajeron los embriones cigóticos a partir de las semillas y se sembraron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Clasificación de los frutos

Se generó una escala de clasificación de frutos en 10 estados de maduración con base en el peso fresco (g), tamaño (mm) y color de 60 frutos de cada árbol. Posteriormente, los frutos de cada estado fueron seccionados de manera longitudinal para exponer a sus embriones y observarlos bajo un microscopio estereoscópico a un aumento de 2 y 4X, para documentar el grado de desarrollo de las semillas y de sus respectivos embriones para cada uno de los 10 estados establecidos anteriormente.

Germinación

Los experimentos de germinación se hicieron con 50 semillas y 50 embriones de los estados de maduración del 5 al 10, correspondiendo a frutos de los tres grupos de maduración: frutos inmaduros (FVO), frutos intermedios (FVA) y frutos maduros (FNR). Los embriones cigóticos y las semillas se sembraron en cajas Petri (60x15 mm) con medio MS al 50% a razón de 10 embriones y 10 semillas por unidad experimental. Después de 30 días se evaluó la germinación de ambos.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos de tamaño y peso para cada uno de los diez estados de maduración de los frutos fueron promediados para obtener sus medias y desviaciones estándar. Para el resto de los experimentos se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 3 tratamientos y 5 repeticiones, para efecto de la maduración de frutos sobre la germinación de semillas, y 2 tratamientos con 5 repeticiones para la comparación de la germinación de semillas y embriones en donde la unidad experimental consistió en una caja Petri con 10 semillas o embriones cigóticos. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico JMP (Java Memory Profiler versión 7, año 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación del fruto

Se encontró que los estados 1-6 muestran un crecimiento más lento con un intervalo de 0.0 a 0.37 con una diferencia media aproximada de 0.40 g y de 0.05 mm entre estados. Una vez que comienza el proceso de maduración y éstos pasan de un color verde oscuro a un verde-amarillo y naranja-rojizo se observa un aumento en peso y tamaño de los frutos teniendo una diferencia en peso y tamaño de hasta 1 g y 0.10 mm, respectivamente (Fig. 2, Cuadro 1 y 2). Con base en estos resultados se propone la agrupación de los frutos en tres grupos o escalas de maduración: 1) frutos inmaduros (FVO); del estado 1-6, 2) frutos intermedios (FVA); estados 7 y 8, y 3) frutos maduros (FNR); estados 9 y 10, los cuales fueron diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$), e indica que el peso de los frutos es importante para determinar el grado de maduración de los frutos, mientras que visualmente, el color es un factor fundamental para dicho parámetro. El cambio color es la característica más notoria en muchas frutas durante su maduración, y por ello se utiliza como criterio para definir la madurez de una fruta (Wills *et al.* 1998, Reid 2002, Yommi y Godoy 2002). La transformación más importante es la degradación del color verde, la cual está asociada con la síntesis o desenmascaramiento de pigmentos cuyos colores oscilan entre el amarillo (carotenoides) y el rojo-morado (antocianinas) (Kays, 2004).

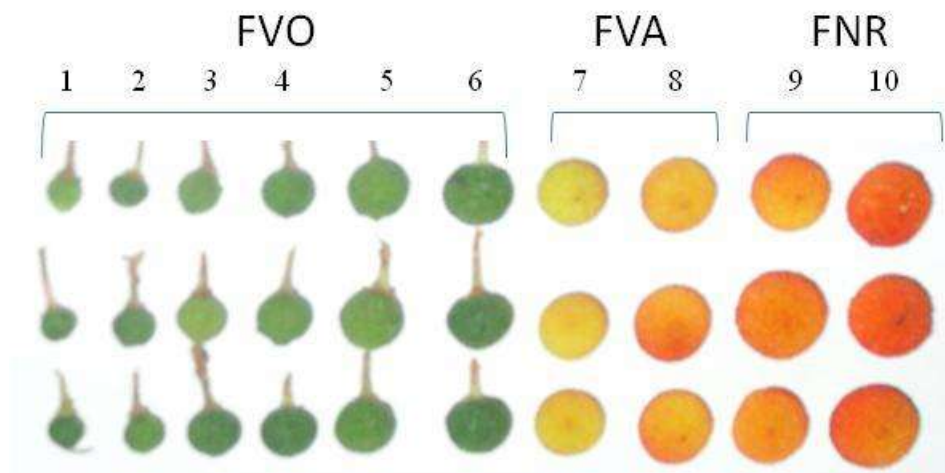


Figura 2. Clasificación de los estados de maduración de los frutos de madroño según su coloración. 1 al 6: frutos verde oscuro (FVO) o frutos inmaduros, 7 y 8: frutos verde-amarillo (FVA) o frutos intermedios, y 9 y 10: frutos naranja-rojizo (FNR) o frutos maduros.

Cuadro 1. Estados de desarrollo de los frutos de *Arbutus xalapensis* Kunth según su tamaño (mm) y peso (g).

EDO. DEL FRUTO	DIÁMETRO (mm)*	PESO (g)*
1	4.60±0.47	0.07±0
2	5.00±0	0.10±0
3	5.60±0.47	0.17±0.03
4	6.60±0.47	0.23±0.01
5	8.00±0.00	0.35±0.02
6	8.00±0.00	0.38±0.03
7	9.00±0.00	0.42±0.00
8	10.00±0.00	0.53±0.01
9	10.30±2.06	0.64±0.13
10	11.30±0.43	0.76±0.06

*Medias y DS correspondientes a cada uno de los estados de maduración de los frutos.

En cuanto al análisis de las variables peso y tamaño de los tres grupos de frutos clasificados según su grado de maduración: frutos inmaduros (FVO), 2) frutos intermedios (FVA), y 3) frutos maduros (FNR), se observaron diferencias significativas, siendo los frutos inmaduros completamente diferentes a los frutos intermedios y maduros, no habiendo diferencias significativas entre estos dos últimos grupos (Cuadro 2). Un estudio similar a la clasificación aquí propuesta es el realizado por Pinzón *et al.* (2007) quienes determinaron, según el color de la cáscara, seis estados de madurez de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) desde totalmente verde (estado 0) hasta sobremaduro (color púrpura intenso, estado 6) para facilitar el reconocimiento del momento óptimo de cosecha.

Cuadro 2. Valores medios para relacionar los tres grupos de madurez con tamaño (mm) y peso (g) del fruto de *A. xalapensis* Kunth.

Nivel	Tamaño (mm)*	Peso (g)*
FNR	10.8 a	0.70 a
FVA	9.5 a	0.46 ab
FVO	6.3 b	0.21 b

*Valores promedios de 3 repeticiones de 10 frutos por cada estado de madurez. Valores con la misma letra no son significativamente distintos ($P \leq 0.05$).

Análisis de microscopía

Este análisis demostró que todos los estados de madurez de los frutos presentan semilla y embriones cigóticos desde el más inmaduro (fruto no. 1) hasta el más maduro (fruto no.10) (Figura 3b, c y d). Asimismo, se detectó que el grado de desarrollo de éstas varía de un estado a otro observándose menor desarrollo de semillas en los estados del 1 al 6, y un mayor desarrollo de ésta a partir del estado 7 (Fig. 3d). La extracción de la semilla sólo fue posible a partir del estado 5, lo cual dio la pauta para elegir los frutos de los estadios 5 al 10 para realizar los estudios de germinación. Las observaciones microscópicas de las semillas, y sus embriones, mostraron claramente que el desarrollo de la semilla va acompañado de la maduración de los frutos, suceso que se da en la mayoría de las plantas gimnospermas (Willan 1987). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Buzeta (1997), quien determinó que existe una relación entre el contenido de semillas en el fruto y el tamaño de éste.

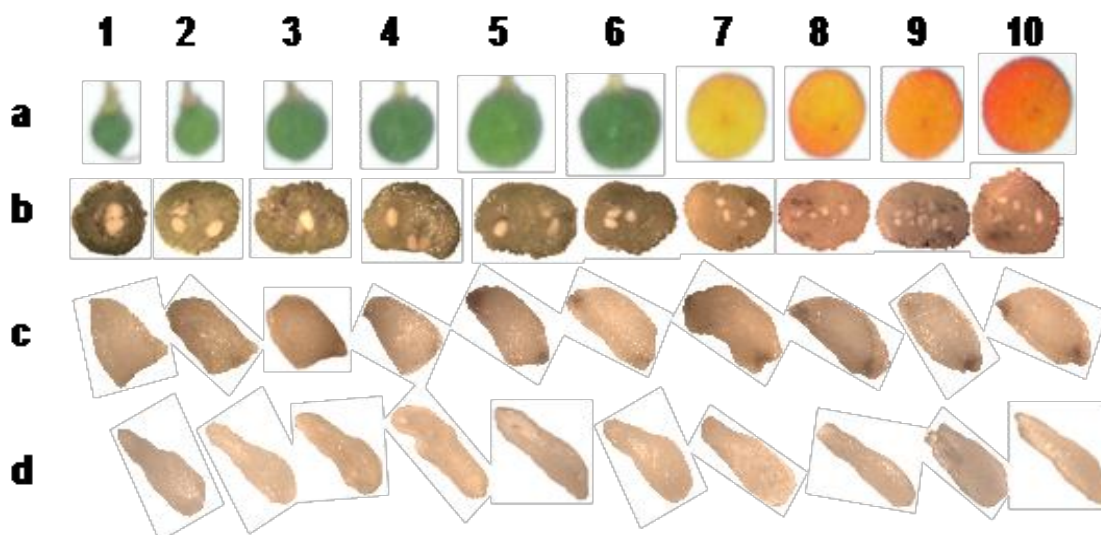


Figura 3. Estados de madurez del fruto de madroño del 1 al 10 (a), y observación microscópica de los frutos (b), semilla (c) y embriones (d) a un aumento de 4X (estados 1-4) y 2X (estados 5-10).

Germinación de semilla y embriones cigóticos

Los resultados obtenidos del análisis estadístico referente a la germinación de semillas mostraron diferencias significativas, observándose una mayor germinación en las semillas provenientes de frutos intermedio (8.8) en comparación con las semillas de fruto inmaduros (8.4) y maduros (7.6), siendo las semillas de los frutos maduros las que mostraron la menor respuesta germinativa (Fig. 4), lo que indica que el estado de madurez del fruto tiene influencia sobre la misma. Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la germinación de las semillas *in vitro* en esta especie (*A. xalapensis*) es afectada por el grado de madurez del fruto, en donde a mayor madurez menor poder de germinación, condición que puede deberse a los mecanismos intrínsecos de las semillas en donde antes de entrar en un periodo de latencia hay una pérdida de humedad e inhibición de su metabolismo, así como producción de inhibidores químicos (α -amilasas) que les permite permanecer en climas con periodos de sequía y frío prolongados (Rodríguez y Vázquez-Yanes, 1992). Algunos estudios realizados con semillas de varias especies de *Arbutus* han demostrado que algunas pierden su poder germinativo en cortos periodos (*A. texana* y *A. unedo*), mientras que otras requieren de temperaturas frías por encima del punto de congelación para poder geminar (*A. menziessi* Pursh) (McDonald, 1978; Nokes, 1986). Narbona *et al.* (2003), encontraron que la germinación de *Arbutus unedo* L., una especie de madroño que crece en el mediterráneo, es afectada por la pulpa que contienen sus frutos concluyendo que ésta debe de presentar algún tipo de inhibidores químicos sin tener la posibilidad de germinar mientras permanezcan adheridas a la pulpa. Sin duda alguna, la eficiencia de germinación y desarrollo de las semillas ésta muy correlacionado con el grado de maduración de los frutos, pues se ha observado que semillas de berenjena provenientes de frutos inmaduros son deficientes en germinación, mientras que aquellas que provienen de frutos maduros, además de tener mayor tamaño, aumentan su porcentaje de germinación (Passam *et al.*, 2010), fenómeno que es observado también en jitomate, pues Heidary y Dastjerdi (2012) reportan que la semilla proveniente de frutos de color rojo presentan mayor eficiencia de germinación que los provenientes de frutos verdes, resultados que difieren de lo aquí obtenido pues a mayor coloración y maduración de los frutos, menor eficiencia sobre la germinación de las semillas de madroño.

De manera opuesta a lo observado con la semilla, se encontró que la germinación de los embriones cigóticos, extraídos de las semillas y sembrados en un medio MS, disminuye de manera considerable (0.4) (Fig. 5), por lo que es muy probable que el medio de cultivo influya más en su germinación que el estado de desarrollo del embrión. Trabajos realizados sobre las respuestas morfogénicas *in vitro* de embriones cigóticos de varias especies de pinos han demostrado la importancia del medio de cultivo sobre dichas respuestas (Ramarosandratana *et al.*, 2001a; Pullman *et al.*, 2003b; Miguel *et al.*, 2004; Niskanen *et al.*, 2004; Lelu-Walter y Bernier-Cardou, 2006). Así, Uddin (1993) observó que la adición de maltosa, sola o combinada con glucosa, y glutamato de sodio al medio básico P6 aumentan la cantidad de embriones cotiledonarios en cultivos embrionarios de varios tipos de gimnospermas. En este mismo sentido Pullman *et al.* (2003b), prueban siete diferentes medios de cultivo basados en el medio P6 modificado con baja concentraciones de sales minerales y adicionados con maltosa o glucosa, casa aminoácidos y carbón activado, encontrando que estos compuestos mejoran la formación de embriones somáticos en *Pinus taeda* L., sin lograr un aumento significativo en su maduración. Así mismo, Pullman *et al.* (2003a), encuentran que el estado de maduración de los embriones cigóticos es fundamental para la iniciación de los cultivos pues los embriones inmaduros producen mayor cantidad de callos embriogénicos en un medio suplementado con nitrato de plata y ácido abscísico.

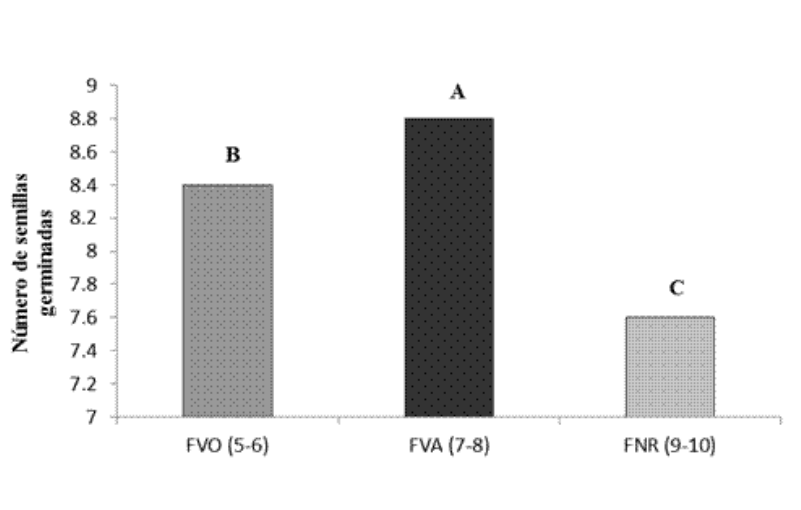


Figura 4. Influencia del estado de madurez del fruto: frutos verde obscuro (FVO), frutos verde-amarillo (FVA) y frutos naranja-rojo (FNR), sobre la germinación de semillas de *Arbutus xalapensis* Kunth a los 30 días de su establecimiento en medio MS básico.

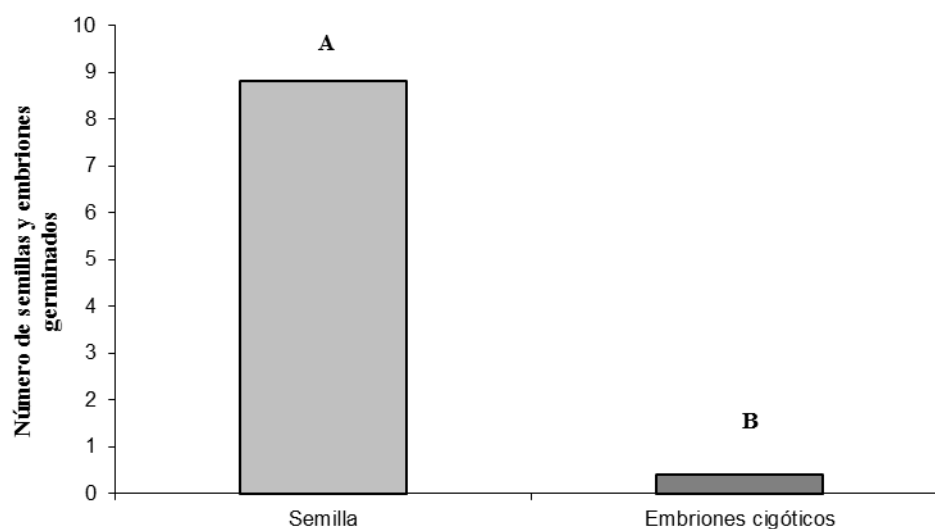


Figura 5. Germinación de semilla y embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunth a los 30 días de su establecimiento en medio básico MS.

CONCLUSIONES

Los resultados generados en este estudio permitieron establecer una escala de clasificación de frutos basada en su tamaño y color: frutos verde oscuro (FVO) o inmaduro (estado 1 al 6), frutos verde amarillo (FVA) o intermedios (7 y 8), y frutos naranja rojo (FNR) o maduros (9 y 10). Las observaciones microscópicas corroboraron que en los 10 estados de los frutos se presentan semillas y embriones, sin embargo los estados del 5 al 10 contienen un mejor desarrollo de éstos. Se encontró que el estado de madurez del fruto influye sobre la germinación de las semillas, observándose que a mayor madurez de frutos menor cantidad de semillas germinadas, mientras que los resultados de eficiencia de germinación de embriones cigóticos mostraron una drástica deficiencia en su germinación. Esto indica que probablemente lo que más influye en la germinación de embriones es el medio de cultivo. Por tanto, se sugiere realizar pruebas de germinación de embriones en diferentes medios de cultivo, así como estudios de morfogénesis *in vitro* con semillas provenientes de frutos de los estados 7 al 10.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rodríguez, S. y J. Barajas-Morales. 2005. Anatomía de la madera de especies arbóreas de un bosque mesófilo de montaña: un enfoque ecológico-Evolutivo. Boletín de la Sociedad botánica de México, diciembre, No. 077. Sociedad botánica de México, A. C. Distrito Federal, México. pp. 51-58.
- Buzeta, A. 1997. Chile: Berries para el año 2000. Departamento Agroindustrial, Fundación Chile. Santiago, Chile. 135 pp.
- Comisión Forestal del Estado de Michoacán, enero de 2009. Boletín informativo No. 2.
- González, E. M. S. y E. M. González. 1992. Una nueva especie de *Arbutus* (Ericaceae, Arbutae) de la Sierra Madre Occidental, México. Acta Botánica Mexicana 17: 7-12.
- Guridi, L. C. 1981. La Madera en las artesanías del estado de Michoacán, Boletín divulgativo N° 50 Subsecretaría Forestal y de la Fauna, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. SARH. Diciembre 1980.
- Heidary, M. y A. M. A. Dastjerdi. Effect of fruit maturity on seed germination of tomato (*Lycopersicon lycopersicon*) www.science.alzahra.ac.ir/Portals/0/Majlat. (Accesada en abril de 2012).
- Hernández-Sandoval, L., C. Romo y F. González-Medrano. 1991. Plantas útiles de Tamaulipas., Botánica, Anales. Instituto de Biología, UNAM G2 (1). pp. 176.
- INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal). 2009. Enciclopedia de los Estados de México: Michoacán, Medio Físico. Gobierno del Estado de Michoacán. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/michoacan> (Accesada en marzo de 2010).
- JMP (Java Memory Profiler). 2008. SAS Institute Inc. Versión 7.
- Kaur, R., S. Arora y A. K. Thukral 2009. Enhancing seed germination of *Chlorophytum borivillanum* Sant. Et Fernand. with PGRs, steroidal hormones and zinc. Research Journal of Seed Science 2: 32-39.
- Kays, S. 2004. Postharvest biology. Exon Press, Athens, Georgia. 568 p.
- Lelu, M. A., M. Bernier., K. Klimaszewska. 2006. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). Plant Cell Reports 25:767-776.

- MacDonald, P. M. 1978. Silviculture-ecology of three native California hardwoods on high sites in north-central California [PhD Dissertation] Corvallis: Oregon State University. Department of Forest Science. 309 p.
- Mesleard, F. y J. Lepart. 1991. Germination in seedling dynamics of *Arbutus unedo* and *Erica arborea* on Corsica. *Journal of Vegetation Science* 2:155-164.
- Miguel, C., S. Gonçalves., S. Tereso., L. Marum., M. M. Oliveira. 2004. Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated seed families of Portuguese plus tree of maritime pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76:121-130.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-479.
- Narbona, E., M. Arista y P. L. Ortiz. 2003. Germinación de las semillas de madroño (*Arbutus unedo* L. Ericaceae). *Acta Botánica Malacitana* 28: 73-78.
- Niskane, A-M., J. Lu., S. Seitz., K. Keinonen., K. von Weissenberg., A. Pappinen. 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiology* 24:1259-1265.
- Nokes, J. 1986. How to grow native plants of Texas and the southwest. Texas Monthly Press, Austin, Texas. USA.
- Passam, M. C., D. Makrogianni., F. Gregriou., y I. C. Karapanos. 2010. The size and germination of eggplant seed in relation to fruit maturity at harvest, after-ripening and ethylene application. *Analele Universității-Fascicula Biologie. Tom XVII, Issue 2.* pp: 225-229.
- Pérez, O. C. P. 1993. Anatomía de la madera de ocho especies con importancia en las artesanías del Estado de Michoacán. *Acta Botánica Mexicana* No. 023. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, México. pp. 103-136.
- Pinzón, I. M. P., G. Fischer y G. Corredor. 2007. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana* 25(1): 83-95.
- Pullman, G. S., S. Johnson., G. Peter., J. Cairney. y N. Xu. 2003a. Improving loblolly pine somatic maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21:747-758.

- Pullman, G. S., K. Namjoshi., Y. Zhang. 2003b. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports* 22:85-95.
- Ramarosandratana, A., L. Harvengt., A. Bouver., R. Calvayrac Y M. Pâques. 2001a. Effects of carbohydrate source, olyethylene glicol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37:29-34.
- Reid, M.S. 2002. Maturation and maturity indices. En: Kader, A. A. (Ed.) *Postharvest technology of horticultural crops*. 3th Edition. University of California, Agricultural and Natural. pp. 55-62.
- Rodríguez, C. y C. Vázquez-Yanes. 1992. La conservación de las plantas en peligro de extinción a través del almacenamiento a largo plazo de semillas. *Interciencia* 17:293-297
- Rzedowski, J. y G. Calderón R. 1985. *Flora fanerogámica del valle de México*. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. México, D. F.
- Rzedowski, J. 2006. Bosque de coníferas. En: *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Tipton, J. L. 1988. Asexual propagation of juvenile *Arbutus xalapensis* in a high humidity chamber. *Plant Propagator* 27: 11-12.
- Uddin, M. R. 1993. Somatic embryogenesis in gymnosperms. U. S. Patent No. 5,187,092.
- Willan, R. L. 1987. A guide to forest seed handling. Chapter 2: Seed and fruit development germination, dormancy. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. M-13 ISBN 92-5-102291.
- Wills, R., B. McGlasson, D. Graham y D. Joyce. 1998. *Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals*. CAB International, Nueva York. 262 pp.
- Yommi, A. y C. Godoy. 2002. Arándanos: Fisiología y Tecnologías de Postcosecha <http://www.elsitioagricola.com/gacetillas/balcarce/bl20021029/arandanos.asp> (Accesada en agosto de 2012).

CAPÍTULO II

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y BRASINOLIDO EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE MADROÑO (*Arbutus xalapensis* KUNTH)

Violeta Tovar Rocha., Ma. del Carmen Rocha Granados, Patricia Delgado Valerio.
Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Esq. Berlín. Col Viveros. C.P. 60190. Uruapan, Mich.

RESUMEN

Se estudió el efecto del medio de cultivo y brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de madroño. Los embriones cigóticos, provenientes de semillas de frutos estériles de los estados de maduración intermedio y maduro, fueron extraídos y colocados en los medios MS, WPM y 889. Los resultados indican que la germinación de los embriones es afectada sustancialmente por el tipo de medio de cultivo utilizado, siendo el medio WPM donde se obtiene un mayor porcentaje de germinación de embriones cigóticos (58%) con respecto al 889 y MS con un 0 y 2% de germinación, respectivamente. La adición de brasinolido en concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg.L⁻¹ al medio 889 y WPM, no ejerció efecto alguno sobre la germinación de embriones, mientras que a concentraciones de 8 y 10 mg.L⁻¹ en el medio MS, tienen el mayor efecto con porcentajes de germinación del 6% y 10%, respectivamente, en contraste con el testigo 0% (0 mg.L⁻¹). Se concluye que la composición del medio de cultivo es fundamental para la germinación de los embriones y que el brasinolido no tienen efecto alguno sobre su germinación *in vitro*.

Palabras clave: *Arbutus xalapensis* Kunth, embriones cigóticos, germinación, MS, WPM, P889, brasinolido.

ABSTRACT

The effect of culture medium and brassinolide on the germination of zygotic embryos of strawberry tree was studied. The zygotic embryos from seeds sterile fruit ripening stages of intermediate and mature, were extracted and placed on MS, WPM and P889 medium. The results indicate that the germination of embryos is affected substantially by the type of medium used, being the medium WPM where it gets a higher percentage of zygotic embryos germination (58%) compared to 889 and MS with 0 and 2% germination respectively. The addition of brassinolide at concentrations of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg.L⁻¹ to the medium 889 and WPM, did not show any effect on the germination of embryos, while at concentrations of 8 and 10 mg. L⁻¹ on MS medium, have the greatest effect germination percentage of 6% and 10% respectively, compared with the control 0% (0 mg.L⁻¹). We conclude that the culture medium is essential for the germination of the embryos and the brassinolide have no effect on *in vitro* seed germination.

Keywords: *Arbutus xalapensis* Kunth, zygotic embryos, germination, MS, WPM, P889, brassinolide.

INTRODUCCIÓN

Arbutus xalapensis Kunth es una especie de importancia ecológica y económica, pero que hasta el momento ha sido poco investigada. La falta de estudios de métodos de propagación vegetal eficientes es un problema mucho más complejo que debe ser atendido. El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permite la propagación *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales bajo condiciones controladas (Hurtado y Merino 1987, Pérez Molphe Balch *et al.* 1999). Para utilizar estas técnicas es indispensable establecer el tipo de medio de cultivo más idóneo para cada especie, pues se ha observado que plantas como la guayaba (*Psidium guajava*) se propaga en forma masiva y de manera eficiente en un medio WPM (Ocampo y Núñez 2007); por su parte, Hossain *et al.* (1993) lograron regenerar plantas completas de papaya (*Carica papaya*) a partir de explantes de peciolos cultivados en medio

MS (Murashige y Skoog 1962), mientras que Pullman *et al.* (2003b) promovieron la iniciación y extrusión de embriones cigóticos de *Pinus taeda* L. en un medio 889. Por su parte, Martínez *et al.* (2004), indujeron la formación de callo y embriones somáticos en forma indirecta en hoja de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake) cultivados en medio B5 (Gamborg *et al.* 1968, 1970). Este medio es muy empleado en el cultivo de protoplastos y en la regeneración de diversas plantas, a diferencia de Nitsch y Nitsch (1969), quienes crearon el medio que lleva su nombre para la obtención de plantas haploides de *Nicotiana* a partir de granos de polen.

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos. Dentro de éstos últimos se encuentran los llamados reguladores del crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999). Los RCV se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Salisbury y Ross 1992). Actualmente se han aislado y estudiado otras sustancias fuera de estos grupos, que se han considerado como RCV, como por ejemplo las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brasinoesteroides (George *et al.* 2008). Éstos últimos, son potentes reguladores vegetales con significativa actividad promotora de crecimiento debido a que están implicadas en la división celular y alargamiento celular, con una gran influencia sobre otros procesos de desarrollo como germinación de semillas, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y maduración (Cutler *et al.* 1991, Sasse 1997). Por ejemplo, el tratamiento de semillas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh con 24-epibrasinolido resultó en un mejoramiento substancial en el porcentaje de germinación (Sasse *et al.* 1995); similarmente, la aplicación de 1 mg.L⁻¹ de brasinolido causó un aumento en la germinación de semillas de *Lepidium sativus* (Jones-Held *et al.* 1996). Además, se ha reportado que aplicaciones exógenas de BR-1 restablecen el enanismo mutante en plantas como chícharo (Nomura *et al.* 1997), jitomate (Clouse y Fieldman 1999) y berro (Asami *et al.* 2000). Así, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del medio de cultivo (889, MS y WPM) adicionado con diferentes concentraciones de brasinoesteroides (brasinolido) sobre la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de madroño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de colecta

La colecta se realizó durante los meses de mayo a junio de 2010 y 2011, periodo de fructificación del madroño. Se seleccionaron dos sitios representativos de la especie con un mayor número de árboles en estado maduro y reproductivo. El primer sitio está ubicado cerca de la localidad de San Miguel Charahuén, municipio de Pátzcuaro (N 19°00'19.5" y W 101°51'05.2, altitud de 1990 msnm), y el segundo sitio en San Jerónimo, municipio de Quiroga (N 19°41'46" y W 101°35'37.3", altitud de 2199 msnm). Estos sitios pertenecen al bosque templado frío, cuya vegetación está representada por especies como *Pinus*, *Abies*, *Quercus*, *Cupressus*, *Alnus* y *Arbutus* (Rzedowski 2006).

Material vegetativo

Se colectaron racimos de frutos en distintos estados de maduración de 20 árboles reproductivos de 6 a 8 m de altura. Los racimos fueron colocados en bolsas de papel de estraza (etiquetadas con el sitio y fecha de colecta) y fueron almacenados en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la UMSNH para su posterior procesamiento y análisis.

Desinfección de la semilla

La desinfección de la semilla se realizó siguiendo el procedimiento reportado en el Capítulo I de materiales y métodos. Una vez desinfectados los frutos, a unos se les extrajo la semilla para ser sembrada en un medio MS (pruebas de germinación), mientras que otros se dejaron en remojo con agua destilada estéril por espacio de 24 horas, con lo cual se facilitó la extracción de los embriones cigóticos de las semillas (efecto del medio y brasinolido).

Medio de cultivo y brasinolido

Se usaron semillas de madroño seleccionadas de acuerdo con la escala de maduración propuesta para madroño en el Capítulo I. Se extrajeron 10 embriones de las semillas y se cultivaron en tres diferentes medios de cultivo (Cuadro 3) en cajas de Petri de 60 x 20 mm: 889 (Pullman *et al.* 2003b), MS (Murashige y Skoog 1962) y WPM (Woody Plant Medium)

(McCown y Lloyd 1981). Además, cada medio de cultivo fue adicionado con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg.L⁻¹ de brasinolido (Tovar 2008).

Cuadro 3. Composición mineral de los medios de cultivo 889, MS y WPM utilizados en la germinación de embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunt.

SALES Y VITAMINAS	889 (mg.L ⁻¹)	MS (mg.L ⁻¹)	WPM (mg.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	200	1, 650	400
KNO ₃	909.9	1, 900	x
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	370	x
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.5	16.9	x
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14.688	8.6	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1725	0.025	0.025
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236.2	x	556
AgNO ₃	3.398	x	x
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256.5	x	x
MgSO·7H ₂ O	x	x	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.125	440	96
MnSO·H ₂ O	x	x	16.9
KI	4.15	0.83	x
K ₂ SO ₄	x	x	990
MgCl ₂ ·6H ₂ O	101.7	x	x
CoCl·6H ₂ O	x	0.025	x
KH ₂ PO ₄	x	170	170
H ₃ BO ₃	15.5	6.2	6.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125	0.25	0.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	18.65	37.3	37.3

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento y medio de cultivo empleado, cuya unidad experimental consistió en una caja petri

con 10 embriones (efecto del medio de cultivo y brasinolido). Los datos obtenidos fueron analizados con las medias de los valores obtenidos, con los que se hizo una prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$). Para los análisis se usó el programa JMP (Java Memory Profiler, versión 7, año 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medios de cultivo y brasinolido

Los resultados del efecto del medio de cultivo sobre la germinación de los embriones cigóticos indicaron que éste tiene un gran efecto sobre la germinación, pues claramente se observó que de los tres medios utilizados en el WPM se obtuvo un mayor cantidad de embriones cigóticos germinados (5.8) con respecto al 889 y MS donde la germinación solo fue de 0 y 0.4 embriones germinados respectivamente (Fig. 6). Esto se debe probablemente a la composición mineral de cada medio de cultivo, ya que el medio 889 contiene baja cantidad de NH_4NO_3 (200 mg.L^{-1}) en comparación con el MS ($1,650 \text{ mg.L}^{-1}$) y el WPM (400 mg.L^{-1}), mientras que la cantidad de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es alta (14.688 mg.L^{-1}) en relación al MS y WPM (8.6 mg.L^{-1} en ambos). Asimismo, la concentración de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es más baja (0.125 mg.L^{-1}) que la utilizada en el medio MS (440 mg.L^{-1}) y en el WPM (96 mg.L^{-1}); observándose de manera general que el medio 899 contiene mayor cantidad de macro y micronutrientes (Cuadro 3). En estudios de morfogénesis *in vitro* en árboles se ha observado la importancia que guarda el medio de cultivo y el desarrollo de los embriones cigóticos en la generación de órganos o embriones somáticos (Cairney *et al.* 2000), ya que muchas especies leñosas son recalcitrantes a los métodos de regeneración *in vitro* (Minocha *et al.* 1999). El medio de cultivo es de suma importancia pues éste debe contener todos los elementos requeridos para el desarrollo de un embrión, de tal manera que reemplace a los cotiledones de las semillas (Tautorius *et al.* 1991, Zimmerman 1993). En este estudio se observó claramente que aunque se ha reportado que las semillas de madroño germinan muy bien en el medio MS (Capítulo I), los embriones cigóticos disminuyen su germinación en el mismo, siendo más eficiente su respuesta en el medio WPM. Pullman *et al.* (2003a), prueban siete diferentes medios de cultivo basados en el medio P6 modificado con baja concentraciones de sales minerales y adicionados con maltosa o glucosa,

casa aminoácidos y carbón activado, encontrando que estos compuestos mejoran la respuesta morfogénica de *Pinus taeda* L.

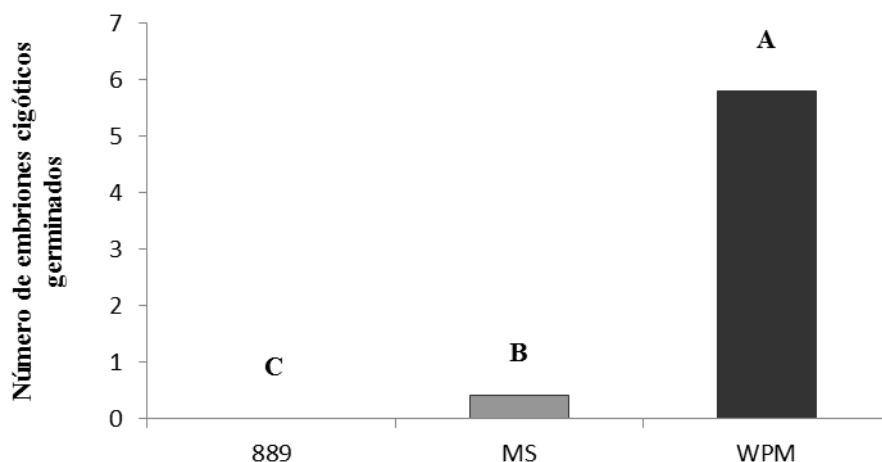


Figura 6. Germinación de embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunth después de 30 días de su cultivo en tres medios distintos.

Referente al efecto del brasinolido sobre la germinación de los embriones en el medio 889, los resultados del análisis muestran que ninguna de las concentraciones tuvo ningún efecto positivo. Mientras que la adición de brasinolido en concentraciones de 8 y 10 mg.L⁻¹ al medio MS, favorecieron la germinación significativamente ($P \leq 0.05$), con un porcentaje de 0.4 a 5.2 de germinación (Cuadro 4, Fig. 7), para el medio WPM la ausencia o presencia de este compuesto no afectó la germinación de los embriones. No obstante a ello, la eficiencia de los brasinoesteroides en la germinación de semilla ha sido comprobada por varios autores (Jones-Held *et al.* 1996, Kaur *et al.* 2009, Leubner-Metzger 2001, Steber y McCourt 2001). Por ejemplo, Jones-Held *et al.* (1996), reportan un aumento en la germinación de semillas de *Lepidium sativum*, utilizando 1 mg.L⁻¹ de brasinolido. Leubner-Metzger (2001) con 0.004 mg.L⁻¹, aplicado en forma directa sobre semillas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana 425, obtuvo un incremento sobre la ruptura del endospermo y consecuentemente un aumento sobre

la germinación de éstas. De igual manera, Steber y McCourt (2001), quienes al utilizar 1 mg.L⁻¹ de brasinolido sobre semillas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en medio MS, determinaron que el regulador actúa como un estimulador de la biosíntesis de giberelinas, responsables de la degradación del endospermo de las semillas, lo cual permite la germinación de las mismas. Similarmente, el tratamiento de semillas de *Eucalyptus camaldulensis* con 24-epibrasinolido (análogo del brasinolido) resultó en un mejoramiento substancial en el porcentaje de germinación de semillas (Sasse *et al.* 1995). Es difícil comparar los resultados obtenidos en este trabajo con lo observado por otros investigadores, ya que en la mayoría de las investigaciones del efecto de los brasinoesteroides sobre la germinación se ha utilizado semilla y no embriones cigóticos; así, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que más que el brasinolido, es el medio de cultivo el que tiene una gran influencia sobre la germinación de los embriones.

Cuadro 4. Efecto del medio de cultivo y concentración de brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunth.

Brasinolido mg.L ⁻¹	MS	WPM
0	0.4 c	5.8 a
2	0.4 c	4.8 a
4	0.6 c	3.8 a
6	0.4 c	5.4 a
8	3.0 b	5.2 a
10	5.2 a	5.2 a

*Los valores seguidos por la misma letra indican que estadísticamente no existen diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).



Figura 7. Efecto del brasinolido sobre la germinación de embriones cigóticos de *Arbutus xalapensis* Kunth en tres medios de cultivo con brasinolido a los 30 días después de su establecimiento *in vitro*.

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que en el medio WPM se obtiene la mayor cantidad de embriones germinados (58%) y la mayor acción de brasinolido en cualquiera de las concentraciones empleadas. En cambio en el medio 889 no se induce la germinación y en el medio MS solo en concentraciones de 8 y 10 mg.L⁻¹, con un porcentaje relativamente bajo de germinación (6% y 10%, respectivamente). Se puede considerar en términos generales que los embriones de *A. xalapensis* Kunth germinan de manera importante tanto con presencia o ausencia del regulador, es decir, que éste no afecta la germinación de los embriones; más bien, este proceso depende ampliamente del medio de cultivo que se utilice. Por tanto, se recomienda realizar estudios utilizando este mismo medio de cultivo adicionado con otro tipo de reguladores de crecimiento que se ha visto tienen influencia en el proceso de germinación como el ABA y las giberelinas.

LITERATURA CITADA

- Asami, T., Y. Ki Min, N. Nagata, K. Yamagishi, S. Takatsuto, S. Fujioka, N. Murofushi, I. Yamaguchi, y S. Yosida. 2000. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* 123: 93-100.
- Cairney, J., N. Xu, J. Mackay, and J. Pullman. 2000. Special symposium: In vitro plant recalcitrance transcript profiling: A tool assess the development of conifer embryos. *In vitro Cellular Development Biology Plant* 36: 155-162.
- Clouse, S. D. y K. A. Fieldman. 1999. En *Brassinosteroids –Steroidal Plant Hormones* (A. Sakurai, T. Yokota, y S. D. Clouse Eds.), Springer, Tokio. pp. 163-190.
- Cutler, H. G., Yokota, T. y Adam, G. 1991. En: *Brassinosteroids-Chemistry, bioactivity and applications*. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington, DC. pp. 474.
- Gamborg, O., R. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 (1): pp. 151-158.
- Gamborg, O. L., F. Constabel, R. A. Miller. 1970. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. *Planta*, 95:355-358.
- George, E., Hall, M. y Klerk, G. 2008. Plant growth regulators III: Gibberellins, Ethylene, Absciscic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. En: *Plant propagation by tissue culture*. 3ª edición. Springer Netherlands. pp. 227-281.
- Hossain, M., S. M. Rahman, R. Islam y O. I. Joarder. 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports* 13:99-102.
- Hurtado, M. D. y M. E. Merino 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. pp.232.
- JMP (Java Memory Profiler). 2008. SAS Institute Inc. Versión 7.
- Jones-Held, S., M. VanDoren y T. Lookwood. 1996. Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth. *Journal Plant Growth Regulation* 15: 63-67.
- Kaur, R., S. Arora y A. K. Thukral 2009. Enhancing seed germination of *Chlorophytum borivilianum* Sant. Et Fernand. with PGRs, steroidal hormones and zinc. *Research Journal of Seed Science* 2 (2): 32-39.

- Leubner-Metzger, G. 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* 213: 758-763.
- Martínez-Ruíz, R., H. S. Azpiroz-Rivero, J. L. Rodríguez de la O., V. M. Cetina-Alcalá y M. A. Gutiérrez-Espinosa. 2004. Embriogénesis somática de *Eucaliptus grandis* Hill Ex. Maiden y *Eucaliptus urophylla* S. T. Blake. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10 (002): 83-92.
- McCown, B. H. y G. Lloyd. 1981. Woody plant médium (WPM). A mineral formulation for microculture of woody plant species. *Journal of Horticultural Science* 16:453.
- Minocha R., D. R. Smith. C. Reeves. K. D. Steele. and S. C. Minocah. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of pinus radiata. *Physiologia Plantarum* 105: 155-164.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- Nitsch, J. P. y C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Nomura, T., M. Nakayama, J. B. Reid, Y. Takeuchi y T. Yokota. 1997. Blockage of brassinosteroid synthesis and sensitivity causes dwarfism in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 113:31-37.
- Ocampo, F y V. M. Núñez. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8 (1): 22-27.
- Pérez Molphe Balch, E. M., R. Ramírez Malagón, H. G. Núñez Palenius y N. Ochoa Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 179.
- Pullman, G. S., S. Johnson., G. Peter., J. Cairney. y N. Xu. 2003a. Improving loblolly pine somatic maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21:747-758.
- Pullman, G. S., Y. Zhang and B. H. Phan. 2003b. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* 22: 96-104.
- Salisbury F. B. y C. W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Co. Belmont, CA. 4ª Edición. 759 pp.

- Sasse, J. M., R. Smith e I. Hudson. 1995. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. *Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America* 22: 136-141.
- Sasse, J. M. 1997. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiologia Plantarum* 100: 696-701.
- Steber, C. M. y P. McCourt. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 763-769.
- Tautorius, T. E., L. C. Fowke, D. I. Donsntan. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal Botany* 69: 1873-1899.
- Tovar, R. V. 2008. Efecto de la brasinolide sobre brotes de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) in vitro. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH. Uruapan, Michoacán, México. 73 pp.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

CAPÍTULO III

ORGANOGENESIS EN MADROÑO (*Arbutus xalapensis* KUNTH)

Violeta Tovar Rocha., Ma. del Carmen Rocha Granados, Patricia Delgado Valerio.
Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Esq. Berlín. Col Viveros. C.P. 60190. Uruapan, Mich.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar la organogénesis directa de madroño utilizando como explantes segmentos de cotiledones de plántulas de 30 días, crecidas *in vitro*. Se realizaron dos experimentos; en el primero los cotiledones de madroño fueron cultivados en medio WPM suplementado con 0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹ de BA y 0, 0.1 y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA y en el segundo experimento se sembraron en el medio WPM suplementado con 0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹ de BA, 0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹ de KIN y 0 y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA. La inducción de callo en el primer experimento se dio al utilizar la combinación de 8 mg.L⁻¹ de BA con 0.5 mg.L⁻¹ de ANA. Mientras que en el segundo experimento todos los tratamientos tuvieron un efecto similar sobre la formación de callo. Sin embargo no se generaron brotes vía organogénesis directa en ninguno de los dos experimentos y bajo ninguna de las combinaciones de los reguladores utilizados, por lo que en ambos casos se produjo tejido calloso.

Palabras clave: Madroño, cotiledones, organogénesis, medio WPM, BA, ANA, KIN.

ABSTRACT

The objective of this research was to study direct organogenesis of strawberry trees using cotyledons as explant segments of seedlings grown *in vitro*. In a first experiment arbutus cotyledons were cultured on WPM medium supplemented with 0, 1, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹ BA and

0, 0.1 and 0.5 mg.L⁻¹ NAA, while the second experiment cotyledons were grown in WPM medium supplemented with 0, 0.5, 1 and 2 mg.L⁻¹ BA, 0, 0.5, 1 and 2 mg.L⁻¹ KIN and 0 or 0.5 mg.L⁻¹ NAA. Callus induction in the first experiment was observed in the combination of 8 mg.L⁻¹ BA with 0.5 mg.L⁻¹ NAA. In the for second experiment, all treatments caused a similar effect on the formation of callus, but no shoot regeneration via direct organogenesis using cotyledons under any of the combinations of the regulators used was observed, and just callus tissue was formed on the explants in both cases.

Keywords: *Arbutus xalapensis* Kunth, cotyledons, organogenesis, medium WPM, BA, NAA, KIN.

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores ventajas que ofrece el cultivo de tejidos es la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos de tejido vegetal incubados en un medio artificial y bajo condiciones ambientales apropiadas (Thorpe 1981). Una de las vía de regeneración de plantas es la organogénesis que, en contraste con la embriogénesis somática, comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos, y se basa en la totipotencialidad celular (Pérez Molphe Balch *et al.* 1999). La organogénesis puede ser de dos tipos: directa (se forman órganos en el explante cultivado sin pasar por el estado de callo) o indirecta (el explante desarrolla tejido calloso y a partir de él crecen yemas adventicias y/o raíces) y emplea tejidos no meristemáticos. Entre los órganos que se pueden formar están los brotes adventicios, los cuales son estructuras muy similares a una yema y tienen la capacidad de elongarse, formar raíces y finalmente originar una nueva planta (Thorpe 1981). Diversos trabajos de investigación sobre dicha técnica de propagación han sido exitosos como el realizado en hipocotilos de *Criptomeria japonica*, para el cual se empleó 1 mg.L⁻¹ de BA en el medio de cultivo y se estimuló la formación de yemas adventicias (Isikawa 1974). Otro estudio realizado en explantes de hoja y tallo de *Citrus*, demostró que el ABA en concentraciones de 0.3 hasta 2.6 mg.L⁻¹ estimuló la formación de callo, específicamente en la zona de abscisión

entre el peciolo y el tallo (Altman y Goren 1971). Por otro lado, explantes de peciolo de papaya lograron la formación de yemas adventicias en medio MS suplementado con 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolizada, 0.5 mg.L de BA y 0.01 mg.L⁻¹ de ANA (Hossain *et al.* 1993), mientras que en cotiledones de *Mucuna pruriens* L., la formación de brotes se indujo en medio MS a la mitad de su concentración adicionado con 1.1 mg.L⁻¹ de BA y 0.09 mg.L⁻¹ de ANA (Faisal *et al.* 2006). Lin y Chang (1998) reportan que con 0.1 mg.L⁻¹ de tidiazuron (TDZ) se logró la exitosa regeneración de plantas completas *Bambusa edulis*. Por tal motivo, se hace necesario el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* que permitan la rápida propagación de *Arbutus xalapensis* Kunth. El objetivo de esta investigación fue estudiar la organogénesis directa de madroño utilizando como explantes segmentos de cotiledones de plántulas crecida *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

Se usaron semillas de madroño para generar plántulas *in vitro* las cuales se sembraron en 30 frascos de cultivo con 30 mL de medio MS básico (el cual contiene sacarosa, macro y microelementos, vitaminas MS y agar-agar) a la mitad de su concentración, sin reguladores de crecimiento y bajo campana de flujo laminar. Se sembraron 10 semillas por frasco hasta la emergencia de los cotiledones (30 días).

Iniciación de los cultivos morfogénéticos

Para evaluar el proceso de organogénesis se establecieron dos experimentos; en el primero se cultivaron diez segmentos de cotiledones (1 cm de longitud, aprox.) por caja petri con medio cultivo WPM, al cual se le adicionaron 0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹ de BA en combinación con 0 y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA. Para el segundo experimento, se cultivaron cinco segmentos de cotiledones (del mismo tamaño que los anteriores) por caja petri (60x15) conteniendo medio WPM adicionado con 0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹ de BA; 0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹ de KIN, y con 0 y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar. Para el primer experimento se utilizaron 15 tratamientos y dos repeticiones por tratamiento, cuya unidad experimental consistió de una caja Petri con 10 cotiledones, mientras que para el segundo se empleó el mismo modelo pero con 9 tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento; la unidad experimental constó en una caja Petri con cinco cotiledones. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa JMP (Java Memory Profiler, versión 7, año 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del primer experimento no mostraron diferencias significativas en la formación de brotes, por lo cual los cotiledones sometidos a las diferentes concentraciones de BA y ANA tienen un efecto similar (datos no mostrados). Por otro lado, el análisis de varianza para la formación de callo, mostró que la combinación de 8 mg.L⁻¹ de BA con 0.5 mg.L⁻¹ de ANA tiene un efecto positivo sobre la inducción de organogénesis somática (Cuadro 5). Estos resultados difieren de los obtenidos por Hossain *et al.* (1993), quienes obtuvieron cultivos de callo a partir de explantes de *Carica papaya* en medio MS adicionado con 0.09-2 mg.L⁻¹ de ANA en combinación con 0.1-1.1 mg.L⁻¹ de BA. De manera similar, Vega (2007) logró la regeneración de brotes de *Psidium guajava* var. China Rosa a partir de yemas apicales o axilares en medio MS, al utilizar como reguladores de crecimiento la combinación de 0.5 mg.L⁻¹ de BA con 0.1 mg.L⁻¹ de ANA. Asimismo, la producción de brotes a partir de explantes de hoja con pecíolo de *Paulownia elongata* se produjo al usar como medio el MS, suplementado con 10 mg.L⁻¹ de BA y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA (Castellanos-Hernández *et al.* 2006), mientras que Tacoronte *et al.* (2002), generaron callo en explantes de *Swietenia macrophylla* King en medio MS adicionado con 1 mg.L⁻¹ de BA con 1.63 mg.L⁻¹ de ANA.

Cuadro 5. Efecto de la combinación de las diferentes concentraciones de BA con ANA sobre la formación de callo.

Combinación (mg.L ⁻¹) de BA con ANA		Número de callos formados	Diámetro de callo (mm)
0	0	0 b	0 b
0	0.1	0 b	0 b
0	0.5	0 b	0 b
1	0	0 b	0 b
1	0.1	0.5 b	0.02 ab
1	0.5	4 ab	0.28 ab
2	0	3.5 ab	0.18 ab
2	0.1	4.5 ab	0.39 ab
2	0.5	6 ab	0.53 ab
4	0	4.5 ab	0.29 ab
4	0.1	5.5 ab	0.31 ab
4	0.5	9 a	0.43 ab
8	0	9 a	0.43 ab
8	0.1	8.5 a	0.65 a
8	0.5	10 a	0.44 ab

Los valores seguidos por la misma letra indican que estadísticamente no existen diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, el análisis para diámetro de callo en relación con los tratamientos, también mostraron diferencias significativas ($F = 0.1307$, $P \leq 0.05$), por lo que el mejor tratamiento para el crecimiento de callo fue la combinación de 8 mg.L⁻¹ de BA con 0.5 mg.L⁻¹ de ANA (Cuadro 5, Fig. 8).

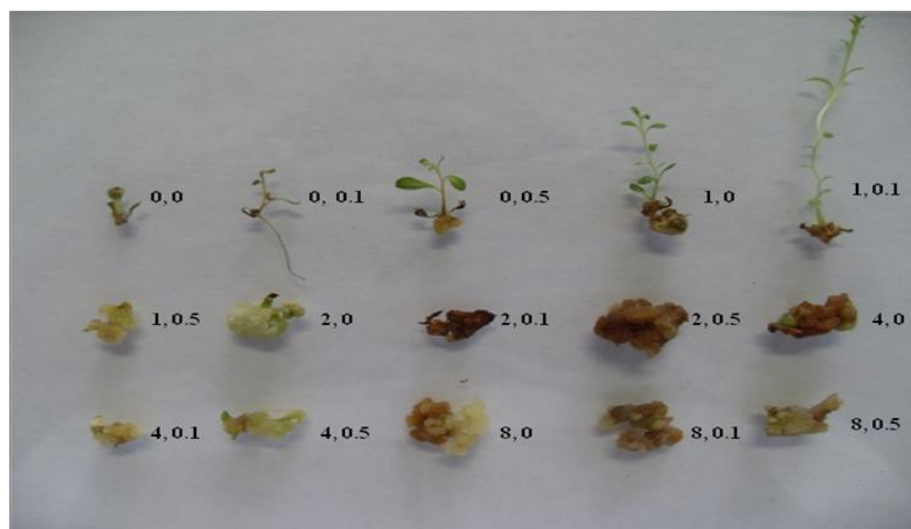


Figura 8. Respuestas morfogénicas de cotiledones de madroño cultivados en medio WPM bajo distintas combinaciones de BA con ANA (mg.L⁻¹) en relación a la formación de brotes, callo y diámetro de callo.

Entre las hormonas más utilizadas en la regeneración de plantas *in vitro* vía organogénesis se encuentran las citocininas, como la bencil-adenina (BA) y la cinetina (KIN), combinadas con las auxinas ácido indol acético (AIA) o bien el ácido naftalen acético (ANA). Así, se montó un segundo experimento en donde se adicionó una tercera hormona la cinetina, debido a que en el primero no se logró la regeneración directa de brotes a partir de los cotiledones. El análisis de varianza para la formación de callo del segundo experimento mostró no haber diferencias significativas entre los tratamientos, actuando de la misma forma (datos no mostrados); además, se pudo observar que al adicionar la cinetina los cotiledones formaron mayor cantidad de raíces y solo algunos formaron poco callo (Fig. 9).

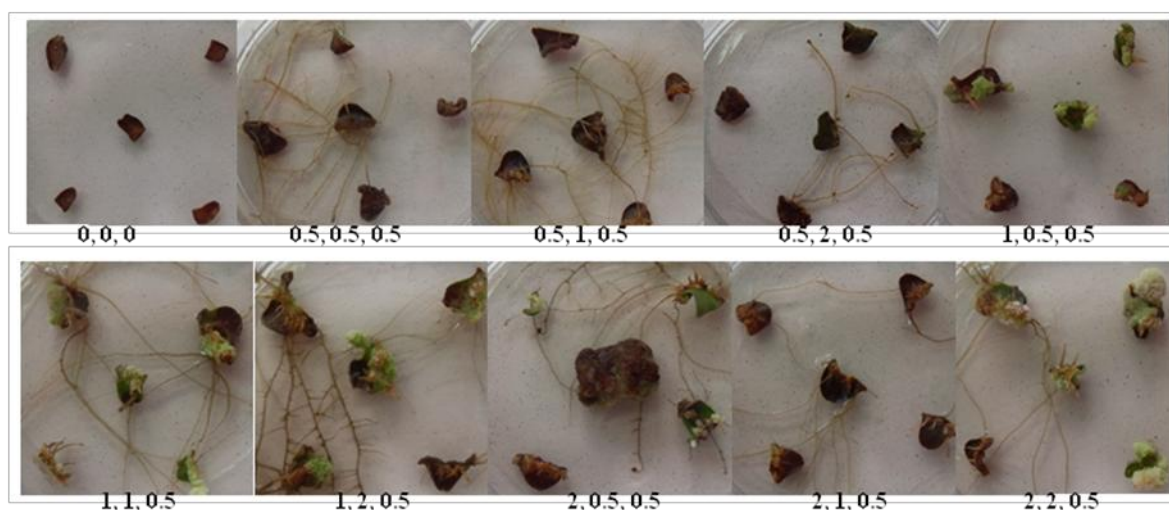


Figura 9. Respuestas morfológicas de cotiledones de madroño cultivados en un medio WPM bajo distintas combinaciones de BA (0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹), KIN (0, 0.5, 1 y 2 mg.L⁻¹) y ANA (0 y 0.5 mg.L⁻¹).

La organogénesis conduce a la diferenciación de meristemos caulinares y/o radiculares, y depende de múltiples factores intrínsecos como la carga genética y niveles hormonales, y extrínsecos tales como la composición del medio, concentración osmótica, concentración y tipo de carbohidratos, luz y temperatura, entre otros. No obstante, el principal factor de control de la morfogénesis *in vitro* son los reguladores de crecimiento (Ammirato 1986, Azcon y Talon 2001, Hartmann *et al.* 1997). Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de los obtenidos por Valverde y Alvarado (2004), quienes lograron la regeneración de *Dalbergia retusa*, una especie maderable que crece desde el sureste de México hasta el noreste de

Colombia, utilizando como explantes segmentos de hipocotilos; ellos observaron que prácticamente los explantes regeneraron en todas las concentraciones de BA, encontrando la mayor formación de brotes (78) a una concentración de 1 mg.L^{-1} . Otros órganos que se han utilizado como explantes para organogénesis han sido las hojas; Mingozi *et al.* (2008), lograron regenerar brotes a partir de hojas de algodón cv. C175 cultivados en un medio semisólido DKW suplementado con 1 mg.L^{-1} de ANA y BA. En nuestro trabajo no fue posible el uso de hojas como explantes, pues las plántulas de madroño crecidas *in vitro* exhibieron hojas muy pequeñas y de difícil manipulación.

CONCLUSIONES

La regeneración de madroño vía organogénesis directa, utilizando cotiledones, no fue posible, obteniéndose tejido calloso compacto de color amarillo y verde, compacto. Los resultados obtenidos en esta investigación respecto al primer experimento indican que la combinación de 8 mg.L^{-1} de BA con 0.5 mg.L^{-1} de ANA es la mejor para inducción de callos, sin lograr la formación de brotes, mientras que la adición de cinetina al medio de cultivo y su combinación con BA y ANA, no mejoró esta condición observándose formación de raíz y explantes con baja eficiencia en formación de callo. Por lo tanto, se recomienda realizar otros experimentos donde se utilicen otros tipos de explantes y diferentes reguladores de crecimiento solos o combinados para la regeneración directa o indirecta.

LITERATURA CITADA

- Altman, A. y R. Goren.1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in citrus bud cultures. *Plant Physiology* 47: 844-846.
- Ammirato, P. V. 1986. Control and expression of morphogenesis in culture. In: *Plant tissue and this agricultural applications*. Withers L. A and P. G. Anderson (eds). University Press Cambridge. Pp: 23-45

- Azcon, B. y M. Talon. 2001. Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. McGraw Hill. Interamericana de España. pp: 381-386, 493-514.
- Castellanos-Hernández, O. A., A. Rodríguez-Sahagún, J. M. Rodríguez-Domínguez y B. Rodríguez-Garay. 2006. Organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*. e-Gnosis. Universidad de Guadalajara. Vol.4, Art.15.
- Faisal, M., I. Siddique y M. Anis. 2006. An efficient plant regeneration system for *Mucunapruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. In Vitro Cellular and Development and Biology-Plant 42:59-64.
- Hartmann, H., D. Kester. F. Davies y R. Geneve. 1997. Plant propagation: Principles and practices. Ed. Prentice Hall. New Yersey, USA. 770 p.
- Hossain, M., S. M.Rahman, R. Islam y O. I. Joarder.1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. Plant Cell Reports 13: 99102.
- Isikawa, H. 1974. *In vitro* formation of adventitious buds and roots on the hypocotyls of *Cryptomeria japonica*. The Botanical Magazine Tokyo 87: 73-77.
- JMP (Java Memory Profiler). 2008. SAS Institute Inc. Versión 7.
- Lin, C. S. y W.C. Chang. 1998. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Reports 17: 617-620.
- Mingozi, M., P. Montello y S. Merkle. 2008. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of Eastern cottonwood *Populus deltoids* cultured under photoautotrophic conditions. Tree Physiology 10 :1-11.
- Pérez Molphe Balch, E. M., R. Ramírez Malagón, H. G. Núñez Palienus y N. Ochoa Alejo. 1999. Organogénesis *in vitro*. En: Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 51-56.
- Tacoronte, M., M. Vielma, C. Valecillos y A. Mora. 2002. Proliferación celular de tejidos foliares de caoba *Swietenia macrophylla* King, cultivados *in vitro*. Pittieria 31: 51-56.
- Thorpe, T. A. 1981. Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press. New York. 379 p.
- Valverde-Cerdas, L. y L. Alvarado-Guzmán. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). Revista de Biología Tropical 52(1): 41-46.

Vega, A. S. 2007. Micropropagación de dos variedades de guayabo (*Psidium guajva* L.) por regeneración *in vitro* de brotes en yemas apicales y laterales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 51 pp.

CAPÍTULO IV

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN MADROÑO (*Arbutus xalapensis* KUNTH)

Violeta Tovar Rocha., Ma. del Carmen Rocha Granados, Patricia Delgado Valerio.

¹Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Esq. Berlín. Col Viveros. C.P. 60190. Uruapan, Mich.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto del regulador de crecimiento conocido como 2,4-D sobre la inducción de callo embriogénico a partir de embriones cigóticos de madroño cultivados en los medios MS y WPM, bajo condiciones de luz u oscuridad. Se usaron frutos de madroño previamente desinfectados, los cuales estaban en estado de madurez intermedio y maduro. Se extrajeron las semillas de los frutos, y de las semillas los embriones cigóticos los que fueron colocados en los medios MS o WPM adicionados con 0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D, y puestos bajo condiciones de luz u oscuridad por espacio de 30 días. Los resultados indican que los embriones cultivados en el medio MS bajo condición de luz, no presentaron respuesta alguna bajo ningún tratamiento al que fueron sometidos. Sin embargo, en oscuridad se logró inducir la formación de callo embriogénico bajo la concentración de 1 mg.L⁻¹ del regulador. Respecto a los embriones cigóticos cultivados en medio WPM en condición de luz, la formación y crecimiento de callo embriogénico se indujo al adicionar 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Mientras que en oscuridad, sólo requirió de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, con lo cual se demuestra que la combinación del medio de cultivo, la concentración del 2,4-D y la condición de luz u oscuridad, son factores fundamentales en la inducción de callos embriogénicos de madroño.

Palabras clave: *Arbutus xalapensis* Kunth, embriogénesis somática, MS, WPM, luz, oscuridad, 2,4-D.

ABSTRACT

The effect of the growth regulator known as 2,4-D on embryogenic callus induction of zygotic embryos of strawberry tree grown in media MS and WPM, under conditions of light or darkness was studied. Strawberry tree fruit in a state of intermediate maturity and mature, were disinfected and then removing zygotic embryos of seeds, which were cultured on MS or WPM media added with 0, 1, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹ of 2,4-D, and placed under conditions of light or darkness for 30 days. The results obtained from embryos cultured on MS medium under light conditions, do not show any response in any treatment they were submitted; however, in darkness embryogenic callus formation was induced on the concentration of 1 mg.L⁻¹ of the regulator. On the other hand, the zygotic embryos cultured on WPM in light conditions, the formation and growth of embryogenic callus was induced by adding 2 mg.L⁻¹ 2,4-D, while in darkness, only 1 mg.L⁻¹ of the hormone was required, thereby demonstrating that the combination of the culture medium, the concentration of 2,4-D and the condition of light or dark, are key factors in the induction of embryogenic callus of strawberry tree.

Keywords: *Arbutus xalapensis* Kunth, somatic embryogenesis, MS, WPM, light, darkness, 2,4-D.

INTRODUCCIÓN

Una de las características más notables del cultivo de tejidos vegetales, es que ciertas células, y bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, tienen la capacidad de formar embriones mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica; a este proceso se le denomina embriogénesis somática (Komamine *et al.* 2005). Los embriones somáticos, al igual que los cigóticos, tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que es un proceso asexual, por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial (Thorpe 2000).

Para que una célula vegetal lleve a cabo el proceso de embriogénesis somática debe estar “determinada” o “inducida”. Debido a esto, las células capaces de formar embriones somáticos reciben el nombre de células embriogénicas determinadas (CED) o células proembriogénicas. Este proceso aún no se conoce a detalle, pero se sabe que implica un cambio drástico en los patrones de expresión genética mediante el cual las células pasan del patrón normal a uno embriogénico (Thorpe 2000, Zimmerman 1992). Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). En la embriogénesis directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original, mientras que en la indirecta, el primer paso indispensable en este proceso es la obtención de tejido calloso o bien, la suspensión celular embriogénica a partir de la cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso (Quiroz-Figueroa 2006).

A nivel biotecnológico, la embriogénesis somática ha sido una de las tecnologías más prominentes para la multiplicación de varios tipos de coníferas en los programas de mejoramiento e ingeniería genética, tecnología con la cual se puede obtener un incremento en la productividad, sustentabilidad y uniformidad de las plantas forestales que se producirán en un futuro en países como Estados Unidos, Canadá y Francia (Park *et al.* 2006, Pullman *et al.* 2003a y b). Para la obtención de embriones somáticos se han utilizado como fuentes de explantes iniciales embriones cigóticos maduros e inmaduros, así como ápices de plantas adultas de varios tipos de pinos (Lelu-Walter *et al.* 2006, Malabadi y Van 2005, Pullman *et al.* 2003b, Tang y Newton 2005). Se ha observado que la adición al medio de cultivo de compuestos como el carbón activado, ácido abscísico y nitrato de plata favorecen la formación de los embriones de algunas especies coníferas como *Pinus taeda*, *Pinus elliottii*, *Picea abies* y *Pseudotsuga menziessi* (Lelu-Walter *et al.* 2006, Malabadi y Van 2005, Pullman *et al.* 2003b), mientras que la proliferación y germinación se ve favorecida cuando se utilizan compuestos como el brasinolido (0.25 mg.L^{-1}), paclobutrazol (1 mg.L^{-1}) que es un inhibidor de la síntesis de giberelinas, y se aplica una parcial deshidratación de los embriones por un periodo de 12 horas (Malabadi y Van 2005, Pullman *et al.* 2003b).

El efecto del medio de cultivo, la concentración de los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento de los callos *in vitro* han sido investigadas en plantas como

Phoenix dactylifera L. (Eke *et al.* 2005), *Phragmites australis* (Lauzer *et al.* 2000), *Eleusine indica* L. (Yemets *et al.* 2003), *Tylophora indica* (Jayanthi y Mandal 2001), *Phragmites australis* (Cui *et al.* 2002), *Cynodon dactylon* (Ramgareeb *et al.* 2001) y *Stenotaphrum secundatum* (Li *et al.* 2006), donde se ha observado que explantes con tejidos suaves y jóvenes expuestos a concentraciones de 1 a 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D e incubados a temperaturas de 24 a 27°C en oscuridad, producen mayor cantidad de tejido calloso y masas proembrionarias conteniendo embriones somáticos en sus diferentes estados de desarrollo (globular, corazón, torpedo y cotiledonario). Así, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del medio de cultivo, la concentración de auxina (2,4-D) y las condiciones de luz y oscuridad, requeridas en la inducción de callos embriogénicos de madroño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de callos embriogénicos

Para determinar el efecto de los factores luz, oscuridad, tipo de medio de cultivo y regulador (2,4-D) sobre la formación y crecimiento de callo embriogénico, se usaron embriones cigóticos extraídos de semillas de frutos previamente desinfectados, utilizando el método reportado en el Capítulo 1, los cuales fueron cultivados en el medio MS o WPM (seleccionados de acuerdo con los resultados reportados en el Capítulo 2), suplementados con 0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Una vez sembrados los embriones en los medios, fueron puestos en condiciones de luz (16/8 h) y oscuridad (24 h) por espacio de 30 días.

Observaciones microscópicas

El estado de embriogénesis de los callos obtenidos a partir de embriones cigóticos se determinó con observaciones en un microscopio compuesto (Leica DM 1000), utilizando varios filtros de luz (blanca, amarilla y roja), con la finalidad de corroborar si los callos eran embriogénicos y los tipos de embriones que los conformaban. Las muestras de callo fueron colocadas sobre portaobjetos y se cubrieron con una gota de agua destilada estéril para evitar su desecación.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 tratamientos que correspondieron a las concentraciones del 2,4-D: 0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹, usando la concentración de 0 mg.L⁻¹ como testigo. La unidad experimental consistió en una caja Petri con cinco embriones y 5 repeticiones, tanto para la condición de luz como de oscuridad, para conocer su influencia sobre la inducción de embriogénesis somática. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias ($P \leq 0.05$) utilizando el programa JMP (Java Memory Profiler versión 7, año 2008).

RESULTADOS

Efecto del 2,4-D y condiciones de cultivo sobre la inducción de callos embriogénicos en el medio MS

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para la formación y crecimiento de callo embriogénico en medio MS, en condiciones de luz, indicaron que ninguna de las diferentes concentraciones del 2,4-D tuvo efecto, no se generaron callos, y por consecuencia crecimiento de éstos (datos no mostrados). De manera contraria, el análisis de varianza para la condición de oscuridad, mostró diferencias significativas ($F = 0.019$, $P = 0.05$). Se observó un mayor número de embriones con formación y crecimiento de callo en la concentración de 1 mg.L⁻¹ del regulador con 1.4 explantes por unidad experimental y con formación de callos de un diámetro aproximado de 0.1 mm. Las concentraciones de 2 y 4 mg.L⁻¹, del regulador presentaron un menor número de explantes con 0.6 y 0.2 explantes por unidad experimental y con formación de callos de un diámetro aproximado de 0.4 y 0.1 mm respectivamente, las cuales fueron estadísticamente iguales entre sí, pero diferentes al medio MS sin regulador de crecimiento (Fig. 10).

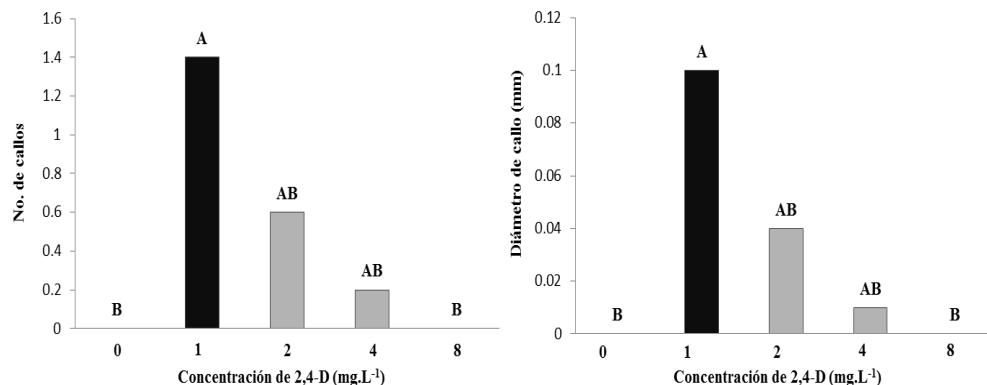


Figura 10. Efecto de la concentración del 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹) y el medio de cultivo (MS), sobre la formación (izquierdo) y crecimiento (derecho) de callo embriogénico en condiciones de oscuridad, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.

Efecto del 2,4-D y condiciones de cultivo sobre la inducción de callos embriogénicos en el medio WPM

Los embriones cultivados en el medio WPM y en condiciones de luz, mostraron diferencias significativas ($F=0.0061$, $P=0.05$), tanto para la formación de callo embriogénico como para su crecimiento, observándose una mayor inducción y crecimiento de callo a concentraciones de 1 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, con un promedio de 3.3 a 3.9 explantes por unidad experimental y con formación de callos con un diámetro aproximado de 0.25 mm. En las concentraciones de 4 y 8 mg.L⁻¹ se observó una inducción y de 2 a 2.3 explantes por unidad experimental que formaron callos con un crecimiento de 0.08 a 0.13 mm (Fig. 11).

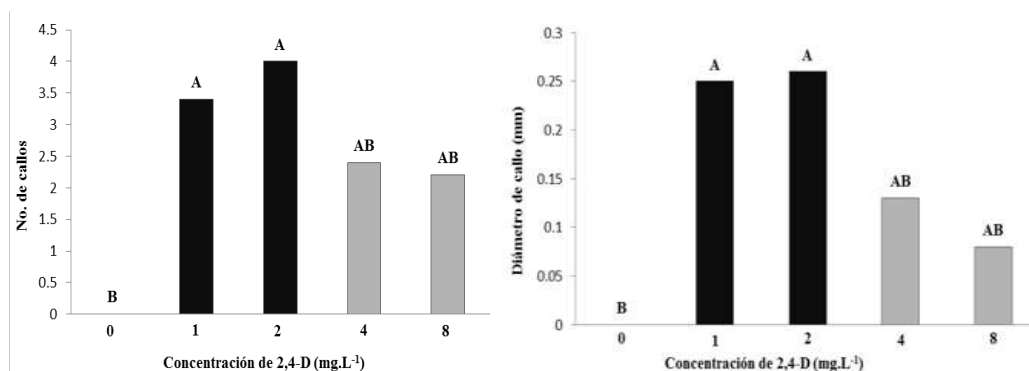


Figura 11. Efecto de la concentración del 2,4-D (0, 1, 2, 4 y 8 mg.L⁻¹) y el medio de cultivo (WPM), sobre la formación (izquierdo) y crecimiento (derecho) de callo embriogénico en condición de luz, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.

En cuanto a los resultados de la inducción y crecimiento de tejido calloso obtenido a partir de embriones cigóticos cultivados en el medio WPM, en condiciones de oscuridad, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($F= 0.0171$, $P= 0.05$), pues en este trabajo se observó que en la concentración de 1 mg.L^{-1} de 2,4-D fue donde se obtuvo el mayor número de embriones (3) por unidad experimental, con un mayor diámetro de crecimiento de 0.2 mm , seguido de las concentraciones 4, 8 y 2 mg.L^{-1} , las cuales fueron estadísticamente iguales entre sí (Fig. 12 y 13).

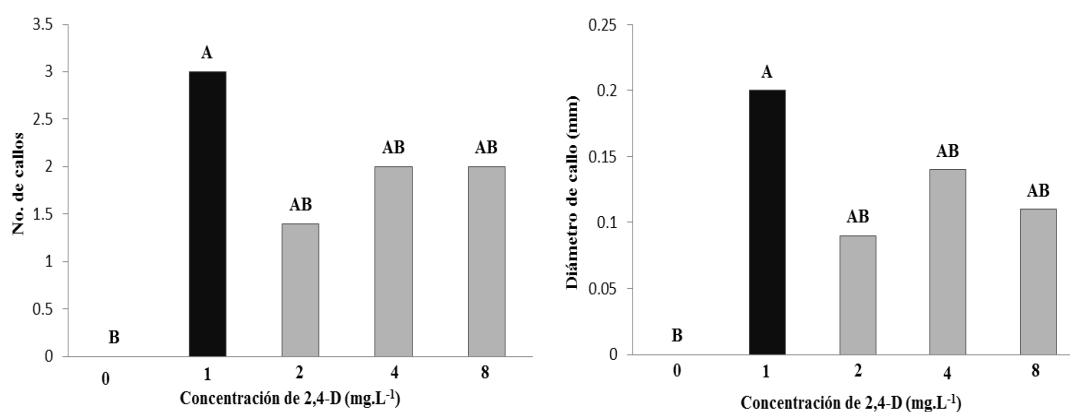


Figura 12. Efecto de la concentración del 2,4-D en el medio de cultivo (WPM), sobre la formación (izquierdo) y crecimiento (derecho) de callo embriogénico, en condiciones de oscuridad, obtenidos a partir de embriones cigóticos de madroño.

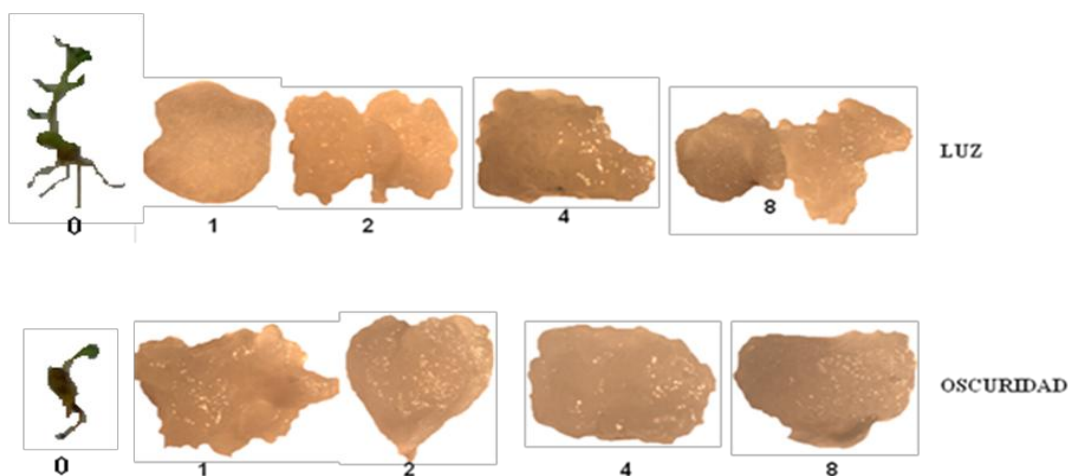


Figura 13. Efecto del 2,4-D ($0, 1, 2, 4$ y 8 mg.L^{-1}) sobre la inducción de tejido calloso de embriones cigóticos de madroño, bajo condiciones de luz y oscuridad, en el medio WPM (Woody Plant Medium).

La visualización microscópica de los callosos embriogénicos, crecidos en el medio WPM en condiciones de oscuridad, reveló que contenían una gran cantidad de embriones somáticos en estado globular, de corazón y de torpedo (Fig. 14), demostrando así que es posible obtener masas embrionarias a partir de embriones cigóticos maduros de madroño, en un medio WPM suplementado con auxinas (2, 4-D) y crecidos en luz u oscuridad.

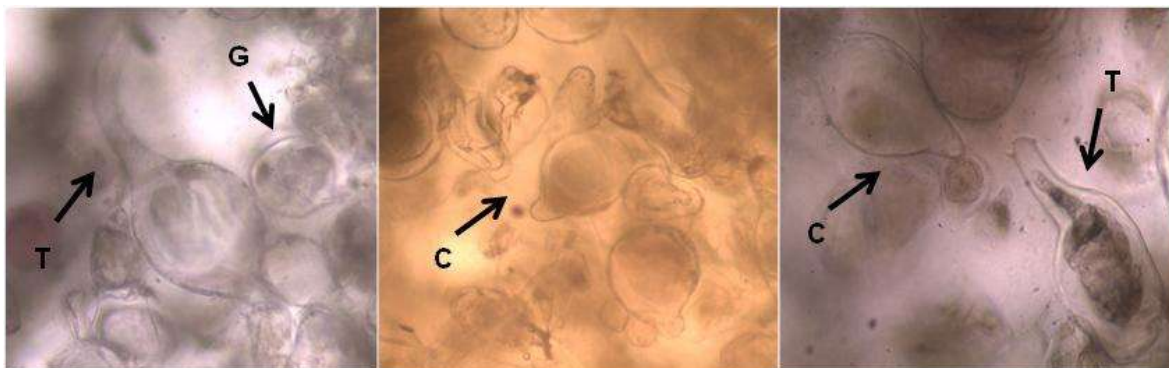


Figura 14. Observaciones microscópicas de embriones somáticos de madroño presentando los estados: globular (G), corazón (C) y torpedo (T); observados a un aumento de 10 X y con filtros de luz blanca (costados) y amarilla (centro).

DISCUSIÓN

La embriogénesis somática es un complejo proceso de desarrollo en el cual las células somáticas son transformadas a células embriogénicas capaces de convertirse en una planta completa (Zeng *et al.* 2007). Las plantas leñosas se han caracterizado por ser más recalcitrantes que las herbáceas a este proceso embrionario (von Aderkas y Bonga 2000), pues poseen una compleja red de factores fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en la formación de los embriones somáticos (Komamine *et al.* 2005). En este trabajo experimental se observó que el medio de cultivo, adicionado con 2,4-D a diferentes concentraciones, fue uno de los factores determinantes en la inducción y desarrollo de los callos embriogénicos de madroño, condición que ya habíamos observado y delimitado en el Capítulo 2, siendo más efectivas las respuestas morfogénéticas en el medio WPM que en el

MS, resultados que concuerdan con lo observado por Li *et al.* (1998) quienes lograron la regeneración de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) vía embriogénesis somática, de 19 diferentes genotipos, utilizando el medio WPM adicionado con 5 mg.L⁻¹ de TDZ, 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg.L⁻¹ de KIN, medio en el que se logró la formación de embriones hasta en un 100% de los explantes. En este mismo sentido, Lardet *et al.* (2008) determinaron que la capacidad de embriogénesis somática de *Hevea brasiliensis* está sujeta en gran medida al tipo de medio utilizado, encontrando que esta especie leñosa responde a los procesos embriogénicos cuando se utilizan delgadas capas de tejido tegumentario de semillas inmaduras sembradas por 25 días en un medio MH (Carron *et al.* 1989) suplementado con 0.6 mg.L⁻¹ de 3, 4-D, 1mg.L⁻¹ de KIN, 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ y 8.2 mg.L⁻¹ de sacarosa. Uno de los trabajos clásicos en coníferas es el de Pullman *et al.* (2003b), quienes han creado un medio específico para obtención de embriones somáticos de varias especies de *Pinus* sp., denominado medio básico 889, rico en casa aminoácidos, maltosa y nitrato de plata, así como adicionado con carbón activados y algunos reguladores de crecimiento.

Además del medio de cultivo y los reguladores de crecimientos utilizados en la iniciación de los cultivos embriogénicos de madroño, aquí observamos que tanto en condición de luz como en oscuridad se induce la formación, desarrollo y crecimiento de callo embriogénico; sin embargo, fue la condición de oscuridad la que permitió su crecimiento consecutivo. Aunque existen muy pocos trabajos como el de Haccius y Lakshmanan (1965), donde reportan la obtención de embriones somáticos de *Nicotiana tabacum* a partir de hojas incubadas en alta intensidad lumínica, son muchas más las investigaciones que denotan la importancia de la oscuridad en la inducción de tejidos embriogénicos. Desde la década de los 70s, Ammirato *et al.* (1974) observaron que la formación de embriones somáticos de *Daucus carota* y *Carum carvi* L., requerían oscuridad para lograr el desarrollo y maduración normal de los embriones. Tejido calloso de palma datilera fue obtenido a partir de meristemos apicales en un medio suplementado con 2,4-D e incubados a 27 °C en la oscuridad, condiciones en la cuales después de tres subcultivos se logró la formación de embriones somáticos (Eke *et al.* 2005). Otros trabajos que también concuerdan con nuestros resultados son aquellos en los que se han utilizado plantas como el trigo (Miroshnichenko *et al.* 2009), fresa (Biswas *et al.* 2007), café (Gatica *et al.* 2008) y uva (Gök-Tangolar *et al.* 2008), donde se encontró que la inducción de

la embriogenesis *in vitro*, utilizando embriones inmaduros, maduros y hojas, se vio influida por la composición del medio, el genotipo, la edad del explante y las condiciones de luz.

CONCLUSIONES

Con este estudio se puede concluir que uno de los factores determinantes en la formación y crecimiento de callos embriogénicos de madroño, es el medio de cultivo (MS y WPM), seguido de la concentración del regulador de crecimiento (2,4-D) y el factor de luminosidad (luz u oscuridad), pues se observó que de los embriones cigóticos cultivados en el medio MS bajo condiciones de luz y oscuridad, sólo aquellos expuestos a la última condición lumínica y con la adición de 1 mg.L^{-1} de 2,4-D formaron callo embriogénico, mientras que los embriones sembrados en el medio WPM, en cualquiera de las concentraciones del 2,4-D en condición de luz u oscuridad, fueron los que mejor respuesta mostraron en cuanto a la inducción del callo embriogénico, y aunque en ambas condiciones (luz u oscuridad) se logró la inducción de callo embriogénico, los callos que crecieron en la luz presentaron un alto grado de necrosis de tejido después de 30 días de cultivo; mientras que los crecidos en oscuridad continuaron con su desarrollo y crecimiento, su diferenciación y/o germinación no fue posible debido a la falta de tiempo para la realización de éstos experimentos.

LITERATURA CITADA

- Ammirato, P. V. 1974. The effect of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). Botanical Gazette 135: 328-337.
- Carron, M. P., F. Enjalric, L. Lardet y A. Deschamps. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5. Trees II. Ed. Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin pp. 22-245.
- Cui, S. X., W. Wang y C. L. Zhang. 2002. Plant regeneration from callus cultures in two ecotypes of reed grass (*Phragmites communis trinius*). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 38: 325-329.

- Biswas, M. K., R. Islam, M. Hossain. 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90: 49-54.
- Eke, Ch. R., P. Akomeah y O. Asemota. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* 4(3): 244-246.
- Gatica, A. M., G. Arrieta y A. M. Espinoza. 2007. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and catuaí: Effect of triacontanol, light conditions, and medium consistency. *Agronomía Costarricense* 32(1): 139-147.
- Gök-Tangolar, S. Büyükalaca, S. Ergenoğlu. 2008. High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: The effect of genotype, media, 2,4-D, and incubation conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32: 311-317.
- Haccius, B. y K. K. Lakshmanan. 1965. Adventiv-embryonen aus *Nicotiana*-kallus der bei hohen lichtintensitäten kultiviert wurde. *Planta* 65: 102-104.
- Jayanthi, M. y P. K. Mandal. 2001. Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. f. Merrill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 576-580.
- JMP (Java Memory Profiler). 2008. SAS Institute Inc. Versión 7.
- Komamine, A., N. Murata, K. Nomura. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspensión cultura – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 6-10.
- Lardet, L., F. Dessailly, M. Carron, P. Montoro y O. Monteuis. 2008. Influences of again cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype. *Tree Physiology* 29: 291-298.
- Lauzer, D., S. Dallaire y G. Vincent. 2000. *In vitro* propagation of reed grass by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 60: 229-234.
- Lelu-Walter, M. A., M. Bernier-Cardoy y K. Klimaszewska. 2006. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait). *Plant Cell Reports* 25: 769-776.
- Li, R., A. H. Bruneau y R. Qu. 2006. Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St. Augustine grass (*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kunze). *Plant Breeding* 125: 52-56.

- Li, Z. A. Traore, S. Maximova y M. J. Guiltinan. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34(4): 293-299.
- Malabadi, R. B. y S. J. Van. 2005. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patulata*. *Tree Physiology* 25: 11-16.
- Miroshnichenko, D., M. Filippov y S. Dolgov. 2009. Effects of diaminozide on somatic embryogenesis from immature and mature embryos of wheat. *Australian Journal of Crop Science* 3(2): 83-94.
- Park, Y. S., M. A. Lelu-Walter, L. Harvengt, J. F. Trontin, I. MacEachron, K. Klimaszewska y J. Bonga. 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. astrobis*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 87-101.
- Pullman, G. S., K. Namjoshi y Y. Zhang. 2003a. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports* 22: 85-95.
- Pullman, G. S., Y. Zhang y B. H. Phan. 2003b. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* 22: 96-104.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 285-301.
- Ramgareeb, S. M., P. Waft y A. J. Cooh. 2001. Micropropagation of *Cynodon dactylon* from leaf and nodal segments. *South African Journal of Botany* 67: 250-257.
- Tang, W. y R. Newton. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports* 24: 1-9.
- Thorpe, T. T. 2000. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 27: 245-258.
- von Aderkas, P. y J. M. Bonga. 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis by manipulation of phase change and culture environmental. *Tree Physiology* 20: 921-928.

- Yemets, A. I., L.V. Klimkina, L.V. Tarassenko y Y. B. Blume. 2003. Efficient callus formation and plant regeneration of goose grass (*Eleusine indica* L. Gaertn.). Plant Cell Reports 21: 503-510.
- Zeng, F., X. Zhang, L. Cheng, L. Hu, L. Zhu, J. Cao and X. Guo. 2007. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. Genomics 90: 620-628.
- Zimmerman, J. L. 1992. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. The Plant Cell 2: 1411-1423.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Los recursos forestales de un bosque templado frío, que incluyen hierbas arbustos y árboles, juegan un papel primordial en la producción (maderable) de los países que poseen estos recursos, así como en el esparcimiento, descanso y actividades de recreación de sus pobladores. Además, tienen una influencia directa en contra de la erosión de los suelos, los ciclos hidrológicos y las condiciones climatológicas de la región (Granados-Sánchez *et al.* 2007).

En México su sobreexplotación se observa como una enorme pérdida en la cubierta forestal y con ello la degradación del ambiente (SEMARNAT 2002). Por Ello se hace necesaria la conservación de sus recursos vegetales con lo cual se contribuirá de manera importante al abastecimiento de los mantos friáticos, a la biodiversidad y a la producción maderable y de otros productos que generen recursos económicos (Mallén 2005).

Este trabajo se enfocó al estudio del madroño *Arbutus xalapensis* Kunth, una especie de árbol asociado a la vegetación de bosque templado frío de Michoacán con problemas de sobreexplotación y conservación, utilizando herramientas biotecnológicas para su reproducción *in vitro*, lográndose establecer y proponer una escala de clasificación de frutos de acuerdo con el tamaño y el color de los mismos: frutos verde oscuro (FVO) o inmaduro (estado 1 al 6), frutos verde amarillo (FVA) o intermedios (7 y 8), y frutos naranja rojo (FNR) o maduros (9 y 10). Esta escala representa un resultado muy importante para el establecimiento *in vitro* utilizando como explante inicial semillas o embriones somáticos de la especie, pues hasta el momento no se ha reportado un estudio similar y con ello se propone formalmente como la primera a nivel mundial para la especie estudiada. La coloración ha sido una de las principales características con la cual se ha relacionado la maduración de los frutos (Reid 2002, Wills *et al.* 1998, Yommi y Godoy 2002). En la mayoría de los frutales se ha observado que conforme maduran el color cambia de verde a rojo o amarillo (Kader y Mitchell 1989a), cuando el color no es un indicador de maduración entonces se utiliza la firmeza de los frutos en donde a mayor firmeza menor grado de maduración (Visagier y Eksteen 1981).

Al observar una muestra al microscopio de cada fruto (de los 10 estados de madurez), se verificó la presencia tanto de semillas como de embriones en todos los estados, siendo los estados del 5 al 10, los que presentaron un mejor desarrollo de semillas y embriones. En la mayoría de las plantas angiospermas, como es el caso de *A. xalapensis* Kunth, se ha demostrado que el desarrollo de la semilla está relacionado directamente con la madurez del fruto del cual proviene (Willan 1987). También se observó que los frutos de los estados del 7 al 10 (mayor tamaño), presentan una mayor cantidad de semilla y embriones más grandes. En este sentido Buzeta (1997), determinó que existe una relación entre el contenido de semillas en el fruto y el tamaño de éste, encontrando que a mayor madurez de fruto mayor desarrollo y número de semillas.

Así mismo, en este trabajo se pudo observar que la germinación del madroño depende del grado de madurez del fruto, en donde a mayor madurez menor poder de germinación, condición que puede deberse a los mecanismos intrínsecos de las semillas en donde antes de entrar en un periodo de latencia hay una pérdida de humedad e inhibición de su metabolismo, así como producción de inhibidores químicos (α -amilasas) que les permite permanecer en climas con periodos de sequía y frío prolongados (Rodríguez y Vázquez-Yanes, 1992). Algunos estudios realizados con semillas de varias especies de *Arbutus* han demostrado que algunas pierden su poder germinativo en cortos periodos (*A. taxan* y *A. unedo*), mientras que otras requieren de temperaturas frías por encima del punto de congelación para poder germinar (*A. menziessi* Pursh) (McDonald, 1978; Nokes, 1986). Narbona *et al.* (2003), encontraron que la germinación de *Arbutus unedo* L., una especie de madroño que crece en el mediterráneo, es afectada por la pulpa que contienen sus frutos concluyendo que ésta debe de presentar algún tipo de inhibidores químicos sin tener la posibilidad de germinar mientras permanezcan adheridas a la pulpa.

Semillas de *Arbutus menziesii* (madroño del Pacífico) al ser colectadas durante el periodo de maduración y sometidas a secado, pueden ser almacenadas a temperatura ambiente de 1-2 años (Mirov and Kraebel 1939). Al parecer esto aplica para *A. xalapensis*, aunque no conocemos algún reporte respecto a los factores que afectan su germinación; actualmente en

el Laboratorio de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, se está llevando a cabo un trabajo para evaluar la germinación de sus semillas después de haber sido almacenadas (sin separarlas del fruto) en bolsas de papel estraza a temperatura ambiente y en refrigeración a 4 °C durante un año. Los resultados preliminares indican que las semillas no presentan problema alguno para germinar, aunque aún falta por evaluar su germinación a periodos mayores de 2 años.

Se ha visto que el desarrollo y germinación de las semillas depende directamente del grado de maduración de los frutos y esto es precisado en un estudio realizado por Passam *et al.* (2001), quienes observaron que las semillas de berenjena provenientes de frutos inmaduros son deficientes en germinación, mientras que aquellas que provienen de frutos maduros, además de tener mayor tamaño, aumentan su porcentaje de germinación. Heidary y Dastjerdi (2012), determinaron que la semilla de jitomate de frutos rojos son las más eficientes para germinar; lo cual no difiere de lo aquí obtenido, pues el color de los frutos no tiene relación sobre la germinación de semillas de madroño. En cambio, la germinación de los embriones en medio MS resultó ser menos eficiente, ya que sólo 0.4 embriones cigóticos germinaron independiente del estado de maduración del fruto del cual provenían los embriones. Probablemente lo que más influye en su germinación es el medio de cultivo utilizado y no el estado de desarrollo del embrión. Trabajos que sirven como referencia de soporte para esta propuesta son los realizados por McCown y Lloyd (1982) en azálea, Chalupa (1984) en roble y tilo, Reed y Abedelnour-Esquivel (1991) en arándano, Mereti *et al.* (2002) en madroño, Ocampo y Núñez (2007) en guayaba; todas estas especies fueron propagadas exitosamente en el medio de cultivo WPM, pues es específico para plantas de tipo leñosas. Mackay (1996), quien utilizó como medio de cultivo el Woody Plant Medium (WPM) adicionado con distintas concentraciones de 6-N-bencil adenina (BA), reporta la micropropagación *in vitro* de madroño, obteniendo un 90 % de brotes axilares propagados.

Derivado de los resultados obtenidos en el trabajo anterior, se decidió conocer el efecto que tienen los medios de cultivo 889, MS y WPM suplementados con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento conocido como brasinolido, sobre la germinación de embriones cigóticos de madroño. Los análisis indicaron que el medio de cultivo es determinante para que

los embriones germinen, esto se debe probablemente a la composición específica de cada medio. Tautorus *et al.* (1991) y Zimmerman (1993), refieren que el medio de cultivo es un factor determinante en el desarrollo de un embrión, pues éste debe contener todos los elementos que requiere el embrión, reemplazando así a los cotiledones de las semillas. En este estudio se observó claramente que aunque las semillas de madroño germinan muy bien en medio MS (Tovar *et al.* Capítulo II), los embriones cigóticos germinan mejor en medio WPM.

Los reguladores de crecimiento juegan un papel primordial en las respuestas morfogénicas de las plantas cultivadas *in vitro*. Algunos de ellos están íntimamente relacionados con la germinación de las semillas como al ácido giberélico (AG₃), ácido abscísico (ABA) y los brasinosteroides (George *et al.* 2008). Debido a la baja eficiencia de germinación de los embriones cigóticos en el medio MS, se efectuó un experimento en el cual se probaron diferentes medios de cultivo adicionados con brasinolido. El efecto del brasinolido sobre la germinación de los embriones en los diferentes medios de cultivo (P889, MS y WPM), no fue relevante, pues este último resultado difiere de lo reportado por investigadores como Jones-Held *et al.* (1996), quienes obtuvieron un aumento en la germinación de semillas de *Lepidium sativum*, al utilizar 1 mg.L⁻¹ de brasinolido, al igual que Leubner-Metzger (2001), quien aplicó directamente 0.04 mg.L⁻¹ del mismo regulador sobre semillas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana 425, con lo que logró aumentar la ruptura del endospermo y en consecuencia, aumentar su germinación. Así mismo, Steber y McCourt (2001), emplearon brasinolido sobre semillas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en medio MS y determinaron que su efecto positivo sobre la germinación se debe a que este regulador funciona como inductor de la biosíntesis de giberelinas, las que son responsables de la degradación del endospermo de las semillas, lo cual permite su germinación. De manera semejante, el tratamiento de semillas de *Eucalyptus camaldulensis* con 24-epibrasinolido (análogo del brasinolido) mejora de manera importante el porcentaje de germinación (Sasse *et al.* 1995).

Aunque ya se ha comprobado el efecto positivo que el brasinolido tiene sobre la germinación, se hace complicado el analizar los resultados obtenidos por otros investigadores con los aquí expuestos, pues los trabajos realizados con este regulador han empleado semilla y no embriones cigóticos. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que más que el

brasinolido, es el medio de cultivo el que tiene una gran influencia sobre la germinación de los embriones.

A partir de los resultados anteriores, se logró establecer el grado de maduración de los frutos con mayor número y tamaño de semillas, y embriones cigóticos con mayor facilidad de extracción, así como el medio de cultivo más idóneo para llevar a cabo estudios de organogénesis y embriogénesis somática.

El factor más importante del cual depende el éxito de la morfogénesis *in vitro* son los reguladores de crecimiento (Ammirato 1986, Azcon y Talon 2001, Hartmann *et al.* 1997,). Valverde y Alvarado (2004), tuvieron éxito al regenerar segmentos de hipocotilos de *Dalbergia retusa* (especie maderable que crece desde el sureste de México hasta el noreste de Colombia), los cuales formaron brotes prácticamente en todas las concentraciones de BA probadas; sin embargo, observaron que la mayor cantidad de brotes se produjo en concentración de 1 mg.L⁻¹ (78 brotes). También se han empleado otros órganos como fuente de explante para el mismo proceso, como es el caso del algodón (cv. C175), en el cual sus hojas fueron cultivadas en medio semisólido DKW suplementado con 1 mg.L⁻¹ de ANA y BA, combinación que produjo la regeneración de brotes (Mingozzi *et al.* 2008). En el presente trabajo no se logró la regeneración de brotes a partir de cotiledones bajo ninguna combinación de los reguladores empleados; además, el uso de hojas como explantes no fue posible debido a que las plántulas de madroño crecidas *in vitro* presentaban hojas pequeñas, y por consiguiente su manipulación resultó difícil, siendo pertinente utilizar otros órganos, como hipocotilos y embriones cigóticos, como explantes iniciales para la inducción de organogénesis directa o bien realizar diferentes pruebas para la obtención de tejido calloso y de éste la regeneración de brotes adventicos (organogénesis indirecta) o bien la formación de embriones somáticos.

Para conocer cómo se da el proceso de la embriogénesis somática se llevó a cabo un experimento en el cual se utilizaron embriones cigóticos de madroño como explantes, cultivados en dos medios de cultivo: MS y WPM, adicionados con 2,4-D en diferentes concentraciones y en condiciones de luz y oscuridad. De los embriones cultivados en medio MS, sólo aquellos que estuvieron bajo la concentración de 1 mg.L⁻¹ del regulador y en

condición de oscuridad, presentaron formación y crecimiento de callo. La inducción y crecimiento de callo de los embriones cultivados en medio WPM y en condición de luz, se logró al adicionar 1 ó 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; mientras que, los embriones cultivados en este medio pero en condición de oscuridad, sólo requirieron de 1 mg.L⁻¹ del regulador para producir la mayor cantidad de callo embriogénica. Al analizar este tejido calloso al microscopio, se pudo observar que contenía gran número de embriones somáticos en distintos estados (globular, corazón y torpedo; ver figura 14 del capítulo IV). Con estos resultados fue posible determinar que el medio WPM, adicionado con 2,4-D en condición de oscuridad, son los factores que, en combinación, permiten llevar a cabo el proceso de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de madroño. Estos resultados corroboran lo encontrado por Li *et al.* (1998), quienes regeneraron plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un 100 %, vía embriogénesis somática (de 19 diferentes genotipos), al utilizar 5 mg.L⁻¹ de tidiazuron, 2 mg.L⁻¹ de 2, 4-D y 0.3 mg.L⁻¹ de KIN en medio WPM. De manera similar, Lardet *et al.* (2008) determinaron que el proceso de embriogénesis somática de *Hevea brasiliensis*, es determinado por el medio de cultivo y es posible, sólo cuando se cultivan explantes procedentes del tejido tegumentario de semillas inmaduras en medio MH (Carron *et al.* 1989) suplementado con 0.6 mg.L⁻¹ de 3, 4-D, 1mg.L⁻¹ de KIN, 5 mg.L⁻¹ de AgNO₃ y 8.2 g de sacarosa, por un periodo de 25 días.

Por último, en este trabajo se determinó que la condición lumínica (luz u oscuridad) es de suma importancia para que el proceso de embriogénesis somática se logre con éxito, pues a pesar de que se formaron embriones somáticos tanto en luz como en oscuridad (en medio WPM), éstos se desarrollaron mejor en oscuridad, pues en luz sufrieron oxidación. De acuerdo con Monsalve-González *et al.* (2005), la inducción de callo embriogénico a partir de estaminoides de *Theobroma cacao* provenientes del clon ICS-95, se logra de manera exitosa al emplear como medio de cultivo el DKW adicionado con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0.005 mg.L⁻¹ de TDZ como reguladores hormonales y glucosa como fuente de carbono en condiciones de completa oscuridad; mientras que explantes de petaloides del mismo clon, presentan desarrollo embriogénico (pro-embriones) en medio WPM suplementado con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0.3 mg.L⁻¹ de KIN, cuando son cultivados en completa oscuridad. Esto se debe a que el clon presenta altos índices de fenolización (lo cual afecta el cultivo *in vitro*) y es sólo que al

cultivarse en oscuridad se reduce el proceso de oxidación. Investigaciones anteriores han reportado que la mejor formación de callo embriogénico se induce en la oscuridad, pues se reduce la oxidación de las auxinas, que como se sabe, influyen de manera importante en la formación de éstas estructuras (Pérez 1998).

VIII. RECOMENDACIONES

Aunque mucho se avanzó en la clasificación de frutos y determinación de los estados de maduración que presentan estos en referencia a la formación de la semilla y los embriones cigóticos de madroño, así como en las condiciones básicas para su cultivo *in vitro*, aun se requiere de estudios adicionales para determinar la mejor fuente de explante para la regeneración de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática. Al final de este trabajo de investigación se recomienda:

1. Realizar estudios de organogénesis *in vitro* con embriones cigóticos de semillas provenientes de frutos de los estados 7 al 10, así como utilizar cotiledones e hipocotilos de plántulas de madroño, para generar tejido calloso y su subsecuente regeneración indirecta.
2. Debido a que no se logró la regeneración de brotes adventicios a partir de cotiledones de *A. xalapensis* Kunth empleando BA y ANA como reguladores de crecimiento, se sugiere utilizar otros reguladores como el 2,4-D para inducir el desarrollo de tejido calloso y la formación de masas embriogénicas mediante el proceso de organogénesis y su posterior regeneración.
3. Utilizar reguladores de crecimiento que permitan la conversión de masas embriogénicas a plantas completas vía embriogénesis somática.
4. Analizar las raíces de *Arbutus xalapensis* (Kunth) (provenientes de las zonas de colecta ya establecidas), para determinar si existe la presencia de organismos benéficos (micorrizas) que ayuden a su establecimiento *ex vitro*, pues al momento no se ha logrado su adaptación en invernadero.

IX. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ammirato, P. V. 1986. Control and expression of morphogenesis in culture. In: Plant tissue and this agricultural applications. Withers L. A and P. G. Anderson (eds). University Press Cambridge. pp. 23-45.
- Álvarez, M. J. C., D. M. Beltrán P. y N. Mesa L. 2011. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* roxb. Tumbaga 6: 107-124.
- Azcon, B. y M. Talon. 2001. Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. McGraw Hill. Interamericana de España. pp: 381-386, 493-514.
- Banerjee, N. y E. De Langhe. 1985. A tissue culture method for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). Plant Cell Reports 4 (6): 351-354.
- Buzeta, A. 1997. Chile: Berries para el año 2000. Departamento Agroindustrial, Fundación Chile. Santiago, Chile. 135 pp.
- Cantos, M., J. Liñan, F. Perez C. y A. Troncoso. 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de virosis de entrenudo corto. Actas de Horticultura Vol. II, 705-709.
- Cao, X. y F. A. Hammerschlag. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. Congress of ASHS Northeast Region Annual Meeting, Baltimore, Md. 2000, vol. 35, No. 5, pp. 827-832 (25 ref.), pp. 945-947.
- Carron, M. P., F. Enjalric, L. Lardet y A. Deschamps. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5. Trees II. Ed. Y. P. S. Bajaj. Springer. Verlag, Berlin pp: 22-245.
- Chalupa, V. 1984. In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). Biologia Plantarum 26(5): 374-377.
- CIDEIBER (Centro de Información y Documentación Empresarial sobre Iberoamérica). 1998. México: Actividades del Sector Primario. Sector Forestal.
- Comisión Forestal del Estado de Michoacán, enero de 2006. Boletín informativo No. 2.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2002. Estudio para la definición de caracteres científicos, técnicos y productivos del madroño: uso maderero, medicinal y artesanal.

http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/imasd/proyectos_2002/4.htm

- Cutler, H. G., T. Yokota y G. Adam. 1991. En: Brassionosteriods-Chemestry, bioactivity and applications. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington, DC. pp.474.
- Davies, P. J. 1995. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. En: Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Davies, P. J. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-11.
- Díaz, B. H. y M. A. Bello. 1993. Contribución al conocimiento de la flora de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro. Libro Técnico No. 1, CIPAC-Michoacán, INIFAP (SAGAR). 161 pp.
- Etchevers, J. D., C. Prat, C. Balbontin, M. Bravo y M. Martinez. 2006. Influence of land use on carbon sequestration and erosion in Mexico, a review. *Agronomie* 26: 1-9.
- Esquinas, A. J. 1981. Los recursos filogenéticos, una inversión segura para el futuro. Consejo Internacional de Recursos Filogenéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid. 44 pp.
- George, E., M. Hall y G. Klerk. 2008. Plant growth regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscicic acid, their analogues and inhibitors; Miscelaneous compounds. En: Plant propagation by tissue culture. 3^a edición. Springer Netherlands. pp. 227-281.
- Gómez, D., C. Balbontin, A. Monterroso y J. Etchevers. 2006. Soil carbon secuestration in Western Mountain ridges and desert of South America. In: Carbon Sequestration in soils of Latin America. The Haworth Press, 79-1001.
- Granados-Sánchez, D., G. F. López Ríos., M. A. Hernández García. 2007. Ecología y silvicultura en bosques templados. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(1):67-83
- Guridi, L. C. 1980. La Madera en las artesanías del Estado de Michoacán. Boletín divulgativo No. 50. Subsecretaría Forestal y de la Fauna. Instituto Nacional de Investigaciones y Forestales. SARH.
- Hartmann, H., D. Kester. F. Davies y R. Geneve. 1997. Plant propagation: Principles and practices. Ed. Prentice Hall. New Yersey, USA. 770 p.

- Heidary, M. y A. M. A. Dastjerdi. Effect of fruit maturity on seed germination of tomato (*Lycopersicon lycopersicon*). <http://www.science.alzahra.ac.ir/Portals/0/Majlat> (Accesada en abril de 2012).
- Hicks, G. S. 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 30: 10–15.
- Hoyt, E. 1992. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Traducción de Enrique Forero .IBPGR. Editorial Addison Wesley Iberoamericana. México. pp.23-27.
- Hurtado, M. D. y M. E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. pp: 232.
- INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal). 2009. Enciclopedia de los Estados de México: Michoacán, Medio Físico. Gobierno del Estado de Michoacán. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/michoacan> (Accesada en marzo de 2010).
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2001. Climate Change 2001: Impacts, adaptation and vulnerability. Technical summary of group work II. IPCC Third Assessment Report. [http:// www.grida.no/climate/ipcc.tar/](http://www.grida.no/climate/ipcc.tar/) (Accesada en diciembre de 2010).
- Jones-Held, S., M. VanDoren y T. Lookwood. 1996. Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth. *Journal Plant Growth Regulation* 15: 63-67.
- Kader, A.A., F. G. Mitchell. 1989a. Maturity and quality. In: La Rue, J. H., Johnson, R. S. (eds). Peaches, plums and nectarines: Growing and handling for fresh market. University of California Department of Agriculture and Natural Resources Publication No.3331 pp:158-164.
- Lauzer, D., S. Dallaire y G. Vincent. 2000. *In vitro* propagation of reed grass by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 60:229-234.
- Lardet, L., F. Dessailly, M. Carron, P. Montoro y O. Monteuis. 2008. Influences of again cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype. *Tree Physiology* 29: 291-298.

- Lelu-Walter, M. A., M. Bernier-Cardoy, y K. Klimasewska. 2006. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait). Plant Cell Reports 25: 769-776.
- Leubner-Metzger, G. 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. Planta 213: 758-763.
- Li, Z. A. Traore, S. Maximova y M. J. Guiltinan. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant 34(4): 293-299.
- López, D. H., T. Zavala, Q. y M. A. Cadena, H. 1985. Obtención y conservación de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) libres de virus. SARH. Chapingo, Méx. México. Folleto Misceláneo No.3.
- Mackay, W. A. 1996. Micropropagation of Texas Madrone, *Arbutus xalapensis* H. B. K. HortScience 31(6): 1028-1029.
- Malabadi, R. B. y S. J. Van. 2005. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature tress of *Pinus patulata*. Tree Physiology 25: 11-16.
- Mallén, R. C. 2005. Hacia un moderno manejo forestal. Teorema Ambiental. 51: 28-38.
- Maruyama, E., I. Kinoshita, K. Ishii y Sakai. 1996. Cryopreservation approach for the germoplasm conservation of the tropical forest tree species: *Cedrela odorata* L. *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. Plant Cell and Molecular Biology Letter. 13 (3): 297-310.
- McCown, B. H. y G. Lloyd. 1981. Woody plant medium (WPM). A mineral formulation for microculture of woody plant species. Journal of Horticultural Science 16:453.
- McCown, B. H. y G. B. Lloyd. 1982. A survey of the response of *Rhododendron* to in vitro culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2 (1): 77-85.
- McDonald, P. M. 1978. Siviculture-ecology of three native California hardwoods on high sites in north-central California [PhD Dissertation] Corvall is: Oregon State University. Department of Forest Science. 309 pp.
- Mereti, M., K., Grigoriadou y G. D. Nanos. 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. Scientia Horticulturae 93(2): 143-148.

- Mingozi, M., P. Montello y S. Merkle. 2008. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of Eastern cottonwood *Populus deltoids* cultured under photoautotrophic conditions. *Tree Physiology* 10:1-11.
- Mirov, N. T. y C. J. Kraebel. 1939. Collecting and handling seeds of wild plants. USDA Forest Service, Civilian Conservation Corps. Washington, DC. 5 pp.
- Missouri Botanical Garden. 2012. <http://www.tropicos.org/Name/12302864> (Accesada en julio de 2012).
- Monsalve-González. L. S., C. Y. García-Rojas y A. K. Sigarrosa-Rieche. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el Departamento Norte de Santander, Colombia. *Respuestas* 10(1): 21-29.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-479.
- Narbona, E., M. Arista y P. L. Ortiz. 2003. Germinación de las semillas de madroño (*Arbutus unedo* L. Ericaceae). *Acta Botánica Malacitana* 28: 73-78.
- Niembro-Rocas. A. 1986. Árboles y arbustos útiles de México. Ed. Limusa. Universidad Autónoma Chapingo. 206 pp.
- Nokes, J. 1986. How to grow native plants of Texas and the southwest. Texas Monthly Press, Austin, Texas. USA.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001). 2002. 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. pp. 85.
- Ocampo, F y V. M. Núñez. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y tecnología Agropecuaria* 8 (1): 22-27.
- Park, Y., S. M. A. Lelu-Walter, L. Harvengt, J. F. Trontin, I. MacEachron, K. Klimaszewska y J. Bonga. 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 87-101.
- Passam, M. C., D. Makrogianni., F. Gregriou., I. C. Karapanos. 2010. The size and germination of eggplant seed is relation to fruit maturity at harvest, after-ripening and

- ethylene application. *Analele Universității-Fascicula Biologie*. Tom XVII, Issue 2. pp. 225-229.
- Pérez, M. B. E. M., R. Ramírez, M., H. G. Núñez, P. y N. Ochoa, A., 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 179.
- Pérez, O. C. P. 1993. Anatomía de la madera de ocho especies con importancia en las artesanías del Estado de Michoacán. *Acta Botánica Mexicana* No. 023. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, México. pp. 103-136.
- Pérez, P. J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 57-65.
- Plucknett, D. L. y T. Williams J. 1992. Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical. San José Costa Rica. pp. 25-125.
- Ponce-Mendoza, A., P. Boeckx, F. Gutierrez-Miceli, O. Van Cleemput, y L. Vandooven. 2006. Influence of water regime and N availability on the emission of nitrous oxide and carbon dioxide from tropical, semi-arid soils of Chiapas, Mexico. *Journal of Arid Environments* 64: 137-151.
- Pullman, G. S., K. Namjoshi y Y. Zhang. 2003a. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports* 22: 85-95.
- Pullman, G. S., Y. Zhang y B. H. Phan. 2003b. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* 22: 96-104.
- Ramírez, A., G. Pérez, C. Bran y O. Morales. 2004. Propagación por cultivo de tejidos de tres especies de coníferas (*Abies guatemalensis* Redher, *Pinus ayacahuite* Ehr y *Pinus rudi* Ende) e inoculación con hongos micorrizicos para inducir el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de las plantas micropropagadas. Proyecto Agrocyc-2004. ICTA. Quetzaltenango, Guatemala. pp. 13.
- Ranyaphia, R. A., A. A. Maoa y S. K. Borthakurb. 2011. Direct organogenesis from leaf and internode explants of *in vitro* raised wintergreen plant (*Gaultheria fragrantissima*). *ScienceAsia* 37: 186–194.
- Reed, B. M. y A. Abedelnour-Esquivel. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26(10): 1320-1322.

- Reid, M.S. 2002. Maturation and maturity indices. En: Kader, A. A. (Ed.) Postharvest technology of horticultural crops. 3th Edition. University of California, Agricultural and Natural. pp. 55-62.
- Rzedowski, J. y G. Calderón R. 1985. Flora fanerogámica del valle de México. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. México, D. F. 674 pp.
- Rzedowski, J. 2006. Bosque de coníferas. En: Vegetación de México. 1ra. Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Rodríguez, C. y C. Vázquez-Yanes. 1992. La conservación de las plantas en peligro de extinción a través del almacenamiento a largo plazo de semillas. *Interciencia* 17:293-297.
- Rodríguez, J. L. S. y G. J. Espinosa. 1996. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Listado florístico de Michoacán, sección V. Instituto de Ecología A. C., CONACYT, UMSNH, CONABIO. 344 pp.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Co. Belmont, CA. 4^a Edición. 759 pp.
- Sasse, J. M., R. Smith, y I. Hudson. 1995. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. *Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America* 22: 136-141.
- Sasse, J. M. 1997. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiology Plant* 100: 696-701.
- SEMARNAT. 2002. Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2002. Informe Nacional. México. FAO-SEMARNAT.
- Steber, C. M. y P. McCourt. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 763-769.
- Tang, W. y R. Newton. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.) *Plant Cell Reports* 24: 1-9.
- Tautorius, T. E., L. C. Fowke, D. I. Donsntan. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal Botany* 69: 1873-1899.
- Troncoso, A., A. Villegas, C. Mazuelos y M. Cantos. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured “in vitro” with different levels of ammonium nitrate. *Plant Nutrition, Physiology and Applications*. pp.653-654.

- Thorpe, T. A. 1995. In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 543 pp.
- Usher, M. B. 1973. Biological management and conservation. Science Paperbacks. pp. 201-212.
- Valverde-Cerdas, L. y L. Alvarado-Guzmán. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). Revista de Biología Tropical 52(1): 41-46.
- Villalobos-Arámbula, V. M. y F. Engelmann. 1995. Ex-situ conservation of plant germoplasm using Biotechnology. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 376-382.
- Visagie, T. R., G. J. Eksteen. 1981. Picking maturity of stone fruits. Deciduous Fruit Grower 31: 312-317.
- Willan, R. L. 1987. A guide to forest seed handling. Chapter 2: Seed and fruit development germination, dormancy. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. M-13 ISBN 92-5-102291.
- Wills, R., B. McGlasson, D. Graham y D. Joyce. 1998. Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. CAB International, Nueva York. 262 pp.
- Whiters, L. A. 1985. Germoplasm conservation in vitro: present state of research and its applications. In crop genetic resources: conservation and evaluation. J. H. W. Holden and J. T. Williams (Eds.). George Allen & Unwin, London. pp. 139-157.
- Ybarra, G. 2007. Bosques Mexicanos. http://www.wwf.org.mx/wwfmex/prog_bosques.php (Accesada en agosto de 2012).
- Yommi, A. y C. Godoy. 2002. Arándanos: Fisiología y Tecnologías de Postcosecha <http://www.elsitioagricola.com/gacetillas/balcarce/bl20021029/arandanos.asp> (Accesada en agosto de 2012).
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. The Plan Cell. Vol. 5: 1411-1423.